

**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA DE LUGO**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS VETERINARIAS**



***EFFECTO DE LA DIFERENCIA ELECTROLÍTICA DE LA DIETA  
SOBRE LA HOMEOSTASIS ÁCIDO-BASE Y EL METABOLISMO  
ÓSEO EN PERROS BEAGLE***

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO  
DE DOCTORA EN VETERINARIA POR LA  
LICENCIADA DÑA. MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ  
PIÑEIRO.

LUGO, SEPTIEMBRE DE 2007





**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias

Facultad de Veterinaria

Campus Universitario s/n.

27002 Lugo (ESPAÑA)

TELÉFONO 982255900-982285937

**LUIS EUSEBIO FIDALGO ÁLVAREZ y ANA GOICOA VALDEVIRA**, Profesores Titulares de la Unidad de Patología Médica y de la Nutrición, del Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMAN:

Que el trabajo de investigación presentado por la Licenciada en Veterinaria Dña. María Isabel Rodríguez Piñeiro, titulado “Efecto de la diferencia electrolítica de la dieta sobre la homeostasis ácido-base y el metabolismo óseo en perros beagle”, se ha realizado bajo nuestra dirección en la Unidad de Patología Médica y de la Nutrición del Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidad de Santiago de Compostela, y consideramos que cumple todos los requisitos para optar al grado de Doctora.

En Lugo, Junio de 2007

Luis Eusebio Fidalgo Álvarez

Ana Goicoa Valdevira



*Agradecimientos*



*Durante todo este tiempo de esfuerzo y dedicación que finalmente ha tenido como resultado la elaboración de esta memoria, he ido interaccionando y contrayendo una gran deuda con gente que me ha prestado su colaboración, dedicación, conocimientos, amistad y trabajo. Me gustaría transmitir mi mas sincera gratitud a todas esas personas aunque soy consciente de que en unas simples líneas es imposible expresar el profundo agradecimiento por la ayuda que me han brindado.*

- *A mis directores el profesor Luis Eusebio Fidalgo Álvarez y Ana Goicoa Valdevira por orientarme y guiarme durante la realización de esta memoria y por proporcionarme todos los medios para lograr que al fin todos mis esfuerzos se viesan recompensados. Sus sabios consejos y el apoyo que me han brindado me han resultado de gran ayuda a lo largo de esta etapa académica.*
- *Al profesor Luis Felipe de la Cruz Palomino que me ha acompañado activamente durante todos los estudios de tercer ciclo, ayudándome y alentándome para que no abandonara nunca la investigación. También me gustaría agradecerle el gran entusiasmo que ha mostrado siempre y el pequeño empujón que me ha dado para que cómo él hizo salga a formarme en el extranjero.*
- *Al doctor Luciano Espino López que es el alma de este estudio. Su profundo conocimiento del tema, sus ideas innovadoras, su gran amistad y, sobre todo, sus ganas de trabajar y su instinto investigador han hecho posible este trabajo.*
- *A la profesora María Luisa Suárez Rey y al profesor Germán Santamarina Pernas que me han brindado una importante ayuda en todos los aspectos de mi vida, tanto académicos como personales, sin su gran apoyo moral habría abandonado hace tiempo esta “locura”. He de agradecerles también que me impulsaran a realizar estancias y el ánimo que me transmitieron desde aquí cuando estaba lejos porque cómo Marus bien dice: “lo que no mata nos hace fuertes”.*
- *A los profesores Marta Miranda Castañón y Lucas Rigueira Rey con los que tantos momentos he compartido desde el inicio de esta etapa.*
- *A los profesores Jesús Casabiell, Mercedes Vieytes y Félix Vega por asesoramiento técnico durante la realización de las pruebas laboratoriales de este trabajo, sus consejos han sido muy valiosos.*
- *A la Royal Canin por brindarnos la dieta empleada durante el ensayo de forma altruista, demostrando una gran amabilidad.*
- *A Ignacio Boixeda de Nestlé Purina Petcare por proporcionarme la información necesaria de NRC del 2006.*

## Agradecimientos

- *A la Fundación Pedro Barrié de la Maza por proporcionar los medios para hacer realidad lo que hasta este momento sólo podía ser un sueño.*
- *A los cuidadores del animalario del HCV Rof Codina Suso, David y Paco.*
- *A Javier García López “Teipa” por su ayuda en la recogida y en el análisis de las muestras, por colaborar en todo lo que estaba en su mano y desvivirse por que todo saliera bien. Pero lo más importante es que durante estos tres años compartiendo mil horas al día, sé con toda seguridad que podré contar con él siempre.*
- *A Juan Marey Rodríguez por compartir tantas horas de trabajo conmigo al comienzo de nuestra etapa investigadora, y aunque pasamos muchos momentos de agobios y de noches sin dormir por realizar muestreos, todo ello sirvió de base para forjar una gran amistad.*
- *A la Dra. Cristina Carrera también llamada “Cris la del laboratorio” por hacerme ver que la investigación no es tan horrible como en algún momento puede llegar a parecer y por hacer que mi inexperiencia en el laboratorio pasara de provocarme miedo a convertirse en un reto.*
- *A Joaquín Martínez de Fisioloxía por introducirme en el mundo de los RIAs ayudándome en todo lo que estuvo en su mano.*
- *A Edu, Javi y Iago Caruncho, Angélica, Sandra, Ana, Jacinta y Gemma por su colaboración en los muestreos, gracias cada uno de ellos todo resultó mucho más fácil.*
- *A Javi y a Juan de Fisioloxía porque las pocas veces que coincidí con ellos me dejaron francamente impresionada con su gran compañerismo y sus atenciones. Me encantaría haber pasado más horas en su departamento para compartirlas con ellos.*
- *A Natalia Miño por todos sus consejos y por los cafés desestresantes, por hacerme ver que todo es posible con esfuerzo y dedicación, y que los obstáculos pueden ser esquivados con voluntad.*
- *A Eva Castiñeiras por su amistad y por preocuparse por mí en cada momento del día. Todo hubiera sido imposible sin su optimismo y sin su toque diario de realidad.*
- *A Suso por ayudarme en todo lo que pudo mientras vivió en Lugo y porque sigue haciéndolo ahora desde Ourense, demostrando todos los días una inmensa paciencia sin poner nunca una mala cara, por hacerme ver que no todo es negro o blanco ni tan malo como yo suelo verlo, sino que hay una amplia escala de grises. La verdad es que nunca hubiera podido sin él.*



- *A todos mis compañeros del HCV Rof Codina y con especial cariño a Mariano, Óscar y Roberto que pasaron por todo esto antes que yo. A ellos me gustaría agradecerles que hagan que todos los días al venir a trabajar me sienta como en mi casa, porque con el paso del tiempo se han convertido en una segunda familia para mí.*
- *A mis amigos Sonia, Dani, Manuel, Víctor, Patri, Marcos, María, Mar, Betiana, Luz, Carlos, Yolanda y a la mayoría de las personas que ya he citado ya que también tengo la suerte de que se puedan incluir en este epígrafe. A todos ellos me gustaría agradecerles sus palabras constantes de aliento y su infinita paciencia, además me gustaría pedirles disculpas por mis periodos de ausencia y por mi mal genio en relación con los agobios derivados de la realización de este trabajo.*
- *A mis padres, a mis abuelos, a mi tía Marcelina, a mi hermana y en general a toda mi familia, que me han ayudado en todo momento, que han sufrido cuando yo he sufrido y se han alegrado cuando yo me he alegrado, porque al igual que para ellos este día es un orgullo, ellos para mí son un orgullo todos los días.*



## *Abreviaturas y Símbolos*



AAFCO: <i>Assoc. of American Feed Control Officials</i>	DIF: diferencia de iones fuertes
ADH: hormona antidiurética	DPD: deoxipiridinolina
ADN: ácido desoxirribonucleico	EB: exceso de bases
AG: <i>anion GAP</i>	EDTA: ácido etilendiaminetetraacético
Alb: albúmina	EEUU: Estados Unidos
ALP: fosfatasa alcalina	ELISA: ensayo inmunoenzimático
AMP <sub>c</sub> : adenosín monofosfato cíclico	<i>et al.</i> : y otros
ANM: aniones no medibles	F <sup>-</sup> : flúor
ARN: ácido ribonucleico	FA: fosfatasa alcalina
ARN <sub>m</sub> : ácido ribonucleico mensajero	FAC: FA inducida por corticoesteroides
A <sub>TOT</sub> : concentración de tampones débiles no volátiles	FAD: flavín-adenín-dinucleótido
ATP: adenosín trifosfato	FAH: fosfatasa alcalina hepática
DE: desviación estándar	FAO: fosfatasa alcalina ósea
BED: balance electrolítico dietético	FART: fosfatasa ácida tartrato resistente
°C: grados centígrados	FAT: fosfatasa alcalina total
Ca: calcio	FMN: flavín-mononucleótido
CaBP: proteína de unión al calcio	g: gramo
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O: cloruro cálcico dihidratado	G: <i>gauges</i>
CaHPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O: hidrógenofosfato de calcio dihidratado	GH: hormona de crecimiento
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> : Fosfato cálcico	gl: grados de libertad
Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> )(OH) <sub>2</sub> : hidroxiapatita	Gla: ácido gamma-carboxiglutámico
CaSO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O: sulfato cálcico dihidratado	H <sup>+</sup> : ión hidrógeno
CEE: Comunidad Económica Europea	Hb: hemoglobina
cm: centímetros	HCl: ácido clorhídrico
CMO: contenido mineral óseo	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : concentración de bicarbonato
CNM: cationes no medibles	H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> : ácido carbónico
CO <sub>2</sub> : dióxido de carbono	Hct: hematocrito
CO <sub>2t</sub> : dióxido de carbono total	HCV: Hospital Clínico Veterinario
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> : ión carbonato	H <sub>2</sub> O: agua
CPC: cresoltaleína coplexona	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peróxido de hidrógeno
CPI: contribución del fosfato inorgánico	HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
CPtot: contribución de las proteínas totales	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> : ión monohidrógenofosfato
Cr: creatinina	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> : ión dihidrógenofosfato
CT: calcitonina	IL: interleucina
CTx: C-Telopéptido	IV: intravenosa
Cu: cobre	IGF-1: factor de crecimiento insulínico
DCAD: diferencia catión-anión de la dieta	K: potasio
DE: desviación estándar	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> : carbonato potásico
DED: diferencia electrolítica de la dieta	kD: kilodaltons
DEXA: <i>dual energy X-ray absorptiometry</i>	kg: kilogramo
dl: decilitro	KHCO <sub>3</sub> : bicarbonato potásico
DMO: densidad mineral ósea	L: litro

## Abreviaturas y Símbolos

LEC: líquido extracelular	OC: osteocalcina
LIC: líquido intracelular	OH <sup>-</sup> : grupo hidroxilo
mEq: miliequivalentes	P: fósforo
mg: miligramos	pCO <sub>2</sub> : presión parcial de dióxido de carbono
µg: microgramos	PCPI: propéptido carboxiterminal de procolágeno I
Mg: magnesio	PNPI: propéptido aminoterminal de procolágeno I
MgCl 2H <sub>2</sub> O: cloruro de magnesio hexahidratado	PE <sub>2</sub> : prostaglandina E <sub>2</sub>
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O: sulfato de magnesio heptahidratado	PID: piridinolina
ml: mililitros	pK <sub>1</sub> : constante de equilibrio
µl: microlitros	p-NPP: p-nitrofenol
mm: milímetros	pO <sub>2</sub> : presión parcial de oxígeno
µm: micrómetros	ppm: partes por millón
mmHg: milímetros de mercurio	Pr-PTH: péptido relacionado con PTH
mmol: milimoles	PTH: hormona paratiroidea
MS: materia seca	RD: Real Decreto
N: nitrógeno	RIA: radioinmunoensayo
nº: número	rpm: revoluciones por minuto
Na <sup>+</sup> : sodio	RRX: receptor retinoide X
NAD: nicotinamida-adenin-dinucleótido	RVD: receptor de vitamina D
NADP: fosfato de nicotinamida-adenin-dinucleótido	S: azufre
NaHCO <sub>3</sub> : bicarbonato sódico	sem.: semana
ng: nanogramos	SNC: sistema nervioso central
NH <sub>4</sub> : amoníaco	Sr: estroncio
NH <sub>4</sub> Cl: cloruro amónico	TATI: telopéptido aminoterminal de colágeno tipo I
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : sulfato amónico	TCTI: telopéptido carboxiterminal de colágeno tipo I
nM: nanomoles	TGF-β: factor de crecimiento β
nm: nanómetros	TSH: hormona estimulante del tiroides
NRC: <i>Nacional Research Council</i>	VDBP: proteína de unión a vitamina D
NTx: N-Telopéptido	XA <sup>-</sup> : concentración de aniones fuertes no medibles

Índices





# ÍNDICES

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL TEMA.....</b>	<b>3</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
<b>3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>13</b>
3.1. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BÁSICO .....	13
3.1.1. PROCEDIMIENTO TRADICIONAL PARA LA VALORACIÓN DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BÁSICO .....	15
3.1.1.1. EXCESO DE BASES (EB) .....	18
3.1.1.2. <i>ANION GAP</i> .....	18
3.1.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE .....	21
3.2. HOMEOSTASIS DEL CALCIO .....	26
3.2.1. INTRODUCCIÓN: DISTRIBUCIÓN DEL CALCIO CORPORAL.....	26
3.2.2. PRINCIPALES FUNCIONES DEL CALCIO .....	28
3.2.3. HOMEOSTASIS CÁLCICA .....	29
3.2.3.1. HORMONA PARATIROIDEA (PTH).....	30
3.2.3.1.1. ESTRUCTURA, SÍNTESIS Y SECRECIÓN.....	30
3.2.3.1.2. METABOLISMO DE LA PTH.....	32
3.2.3.1.3. ACCIONES FISIOLÓGICAS DE LA PTH .....	33
3.2.3.2. CALCITONINA.....	34
3.2.3.2.1. ESTRUCTURA, SÍNTESIS Y SECRECIÓN.....	34
3.2.3.2.2. METABOLISMO DE LA CALCITONINA .....	35
3.2.3.2.3. ACCIONES FISIOLÓGICAS DE LA CALCITONINA .....	35
3.2.3.3. CALCIFEROLES (VITAMINA D) .....	36
3.2.3.3.1. ESTRUCTURA, SÍNTESIS Y SECRECIÓN.....	36
3.2.3.3.2. METABOLISMO DE LA VITAMINA D .....	41
3.2.3.3.3. ACCIONES FISIOLÓGICAS Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LA VITAMINA D .....	41
3.2.3.4. OTRAS HORMONAS DE INTERÉS .....	45
3.2.3.4.1. PÉPTIDO RELACIONADO CON PTH (PR-PTH).....	45
3.2.3.4.2. HORMONAS SEXUALES: ESTRÓGENOS Y ANDRÓGENOS.....	46

3.2.3.4.3. GH/IGF-1 .....	46
3.2.3.4.4. GLUCOCORTICOIDES .....	48
3.2.3.4.5. TSH Y HORMONAS TIROIDEAS.....	51
3.2.3.4.6. LEPTINA.....	51
3.3. FÓSFORO .....	52
3.3.1. INTRODUCCIÓN: DISTRIBUCIÓN DEL FÓSFORO CORPORAL.....	52
3.3.2. PRINCIPALES FUNCIONES DEL FÓSFORO .....	52
3.3.3. FACTORES QUE REGULAN LAS CONCENTRACIONES DE FOSFATO.....	53
3.4. MAGNESIO.....	55
3.4.1. INTRODUCCIÓN: DISTRIBUCIÓN DEL MAGNESIO CORPORAL .....	55
3.4.2. PRINCIPALES FUNCIONES DEL MAGNESIO.....	56
3.4.2.1. FUNCIONES BIOQUÍMICAS .....	56
3.4.2.2. FUNCIONES FISIOLÓGICAS.....	57
3.4.3. PRINCIPALES FACTORES QUE REGULAN LAS CONCENTRACIONES DE MAGNESIO .....	57
3.5. EL HUESO .....	58
3.5.1. HISTOGÉNESIS DEL HUESO.....	60
3.5.2. COMPOSICIÓN DEL HUESO .....	61
3.5.2.1. CÉLULAS .....	61
3.5.2.2. MATRIZ ÓSEA .....	64
3.5.3. TIPOS DE HUESO .....	65
3.5.4. EL RECAMBIO ÓSEO O REMODELADO DEL HUESO .....	67
3.5.4.1. FORMACIÓN DEL HUESO.....	68
3.5.4.2. RESORCIÓN ÓSEA .....	69
3.5.4.3. SINCRONIZACIÓN ENTRE LA RESORCIÓN Y LA FORMACIÓN ÓSEA .....	70
3.5.5. MARCADORES ÓSEOS.....	72
3.5.5.1. MARCADORES DE LA FORMACIÓN ÓSEA .....	73
3.5.5.1.1. FOSFATASA ALCALINA (FA) .....	73
3.5.5.1.2. OSTEOCALCINA (OC) .....	75
3.5.5.1.3. PROPÉPTIDOS SÉRICOS DE PROCOLÁGENO TIPO I.....	77
3.5.5.2. MARCADORES DE LA RESORCIÓN ÓSEA .....	77
3.5.5.2.1. MARCADORES SÉRICOS .....	77
3.5.5.2.2. MARCADORES URINARIOS .....	80
3.5.5.2.3. VARIABILIDAD DE LOS MARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA A LARGO PLAZO .....	83

3.6. APOORTE DE MINERALES EN LA DIETA .....	83
3.6.1. SODIO Y CLORO .....	84
3.6.2. POTASIO .....	86
3.6.3. CALCIO Y FÓSFORO .....	87
3.6.4. MAGNESIO .....	90
3.7. DIFERENCIA ELECTROLÍTICA DE LA DIETA Y SALES IÓNICAS .....	91
3.7.1. TIPOS DE SALES: ANIÓNICAS Y CATIÓNICAS .....	94
3.7.2. TIEMPOS DE ADMINISTRACIÓN DE LAS SALES .....	95
3.7.3. EFECTOS EN EL EQUILIBRIO ÁCIDO-BÁSICO SANGUÍNEO.....	96
3.7.3.1. MECANISMOS COMPENSADORES FRENTE A LOS CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE IÓN HIDRÓGENO: AMORTIGUADORES DE LOS LÍQUIDOS ORGÁNICOS, PULMONES Y RIÑONES .....	101
3.7.3.1.1. SISTEMAS AMORTIGUADORES DE LOS LÍQUIDOS ORGÁNICOS.....	101
3.7.3.1.2. PULMONES: COMPENSACIÓN RESPIRATORIA.....	102
3.7.3.1.3. RIÑÓN Y FORMACIÓN DE ORINA.....	104
3.7.4. EFECTOS SOBRE LA DIFERENCIA ELECTROLÍTICA PLASMÁTICA.....	107
3.7.4.1. EFECTOS SOBRE EL CLORO.....	107
3.7.4.2. EFECTOS SOBRE EL SODIO Y POTASIO.....	108
3.7.5. EFECTOS SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO Y SOBRE LOS MARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA .....	110
3.7.5.1. EFECTOS SOBRE LAS HORMONAS CALCITROPAS.....	116
3.7.5.2. EFECTOS SOBRE EL METABOLISMO MINERAL: CALCIO, FÓSFORO Y MAGNESIO .....	120
3.7.5.2.1. EFECTOS EN EL PLASMA .....	120
3.7.5.2.2. EFECTOS EN LA ORINA.....	124
3.7.6. OTROS EFECTOS.....	127
3.7.6.1. GLUCOSA.....	127
3.7.6.2. PROTEÍNAS TOTALES Y ALBÚMINA .....	128
3.7.6.3. EFECTOS DE LA DED SOBRE EL HEMATOCRITO Y LA HEMOGLOBINA.....	128
3.7.6.4. EFECTOS DE LA DED SOBRE LA UREA PLASMÁTICA Y LA CREATININA URINARIA .....	129
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>133</b>
4.1. MATERIAL VIVO EXPERIMENTAL.....	133
4.2. ALIMENTACIÓN EXPERIMENTAL.....	134

4.3. PROTOCOLO DE RECOGIDA DE MUESTRAS .....	136
4.3.1. RECOGIDA DE SANGRE ARTERIAL, VENOSA Y DE ORINA.....	136
4.4. PARÁMETROS MEDIDOS Y METODOLOGÍA EMPLEADA .....	137
4.4.1. PARÁMETROS PARA VALORAR EL ESTADO ÁCIDO-BÁSICO SANGUÍNEO .....	137
4.4.1.1. PARÁMETROS MEDIDOS .....	138
4.4.1.2. PARÁMETROS CALCULADOS .....	138
4.4.2. PARÁMETROS PARA VALORAR EL ESTADO ÁCIDO-BÁSICO EN ORINA .....	140
4.4.2.1. PH URINARIO .....	140
4.4.3. MINERALES E IONES ESTUDIADOS.....	140
4.4.4. OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS:.....	142
4.4.5. HEMATOLOGÍA (HEMATOCRITO, HEMOGLOBINA) .....	143
4.4.6. CORTISOL SÉRICO .....	144
4.4.7. MARCADORES ÓSEOS (FAO, TCTI) .....	145
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....	146
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>149</b>
5.1. EFECTOS DE LAS DIETAS EN EL ESTADO ÁCIDO-BASE.....	149
5.1.1. EFECTOS EN EL ESTADO ÁCIDO-BASE SANGUÍNEO .....	149
5.1.1.1. MÉTODO TRADICIONAL .....	149
5.1.1.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO .....	158
5.1.2. EFECTOS EN EL ESTADO ÁCIDO-BÁSICO URINARIO: PH URINARIO .....	165
5.2. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE LOS MINERALES Y ELECTROLITOS SANGUÍNEOS .....	167
5.2.1. SODIO, POTASIO Y CLORO.....	168
5.2.2. CALCIO, FÓSFORO Y MAGNESIO .....	172
5.3. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE OTROS PARÁMETROS HEMÁTICOS: HEMATOCRITO Y HEMOGLOBINA.....	177
5.4. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS: GLUCOSA, PROTEÍNAS TOTALES, ALBÚMINA, UREA Y CREATININA .....	180
5.5. EFECTO DE LAS DIETAS SOBRE EL CORTISOL SÉRICO.....	186
5.6. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE LOS MARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA .....	188
5.6.1. TELOPÉPTIDO CARBOXITERMINAL DE COLÁGENO TIPO I (TCTI).....	188
5.6.2. FOSFATASA ALCALINA DE ORIGEN ÓSEO (FAO) .....	190
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>195</b>
6.1. EFECTOS DE LAS DIETAS EN EL ESTADO ÁCIDO-BÁSICO .....	195
6.2 EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE LOS MINERALES Y ELECTROLITOS SANGUÍNEOS .....	207

6.2.1. SODIO, POTASIO Y CLORO .....	207
6.2.2. CALCIO, FÓSFORO Y MAGNESIO.....	211
6.3. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE OTROS PARÁMETROS HEMÁTICOS: HEMATOCRITO Y HEMOGLOBINA .....	217
6.4. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS: GLUCOSA, PROTEÍNAS TOTALES, ALBÚMINA, UREA Y CREATININA.....	218
6.5. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE EL CORTISOL SÉRICO.....	220
6.6. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE LOS MARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA.....	222
6.6.1. TELOPÉPTIDO CARBOXITERMINAL DE COLÁGENO TIPO I: TCTI.....	223
6.6.2. FOSFATASA ALCALINA DE ORIGEN ÓSEO (FAO).....	227
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>233</b>
CONCLUSIÓN FINAL .....	234
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>237</b>
<b>9. RESÚMENES.....</b>	<b>275</b>
9.1. RESUMEN.....	275
9.2. SUMMARY .....	277



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Definiciones y conceptos .....	14
<b>Tabla 2:</b> Intervalos de referencia para el pH, pCO <sub>2</sub> y HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en perros .....	16
<b>Tabla 3:</b> Valores medios y desviación estándar obtenidos para el pH, pCO <sub>2</sub> y HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> por diferentes investigadores para el perro .....	16
<b>Tabla 4:</b> Valoración del estado ácido-básico. Interpretación de las variables de pH, pCO <sub>2</sub> y HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	17
<b>Tabla 5:</b> Resultados de EB en mEq/L (media ± DE) encontrados por diferentes autores.....	18
<b>Tabla 6:</b> Clasificación de las causas de acidosis metabólica .....	20
<b>Tabla 7:</b> Valores de referencia para parámetros del método cuantitativo en perros .....	23
<b>Tabla 8:</b> Valores medios normales de los parámetros empleados en el análisis cuantitativo del equilibrio ácido-básico en perro .....	26
<b>Tabla 9:</b> Regulación de la actividad de las células óseas .....	71
<b>Tabla 10:</b> Rangos de referencia y las medias (media ± DE) para la fosfatasa alcalina total (FAT) y sus isoenzimas en perros sanos jóvenes, adultos y geriátricos .....	74
<b>Tabla 11:</b> Rangos de referencia para la fosfatasa alcalina total (FAT) y la isoenzima ósea en perros de diferentes edades .....	74
<b>Tabla 12:</b> Rangos de referencia para la osteocalcina en perros de diferentes edades .....	76
<b>Tabla 13:</b> Rangos de referencia para el TCTI en perros de diferentes edades .....	80
<b>Tabla 14:</b> Concentraciones medias de piridinolina y deoxipiridinolina en orina en perros de diferentes edades.....	82
<b>Tabla 15:</b> Concentraciones medias de NTx y CTx en orina en perros de diferentes edades.....	82
<b>Tabla 16:</b> Funciones del sodio, cloruro, potasio y efectos de sus deficiencias y excesos.....	87
<b>Tabla 17:</b> Composición química de las principales sales aniónicas .....	94

<b>Tabla 18:</b> Resumen de las sales catiónicas empleadas más frecuentemente en la nutrición de aves y porcino y de sus principales características.....	95
<b>Tabla 19:</b> Valores fisiológicos de electrolitos en el plasma canino .....	110
<b>Tabla 20:</b> Valores normales en el perro adulto para el calcio, fosfato y magnesio .....	122
<b>Tabla 21:</b> Composición química de la dieta control.....	134
<b>Tabla 22:</b> Composición electrolítica de las 3 dietas empleadas.....	135
<b>Tabla 23:</b> Distribución de los muestreos.....	136
<b>Tabla 24:</b> Valores medios y desviación típica del pH en sangre arterial para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo.....	150
<b>Tabla 25:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre el pH sanguíneo .....	150
<b>Tabla 26:</b> Valores medios y desviación típica de la $p\text{CO}_2$ (mmHg) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	151
<b>Tabla 27:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la $p\text{CO}_2$ sanguínea .....	152
<b>Tabla 28:</b> Valores medios y desviación típica del bicarbonato (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo.....	153
<b>Tabla 29:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración de bicarbonato sanguíneo .....	153
<b>Tabla 30:</b> Valores medios y desviación típica del $\text{CO}_2\text{t}$ (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	154
<b>Tabla 31:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre el $\text{CO}_2\text{t}$ sanguíneo .....	155
<b>Tabla 32:</b> Valores medios y desviación típica del exceso de base (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo.....	155
<b>Tabla 33:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre los niveles de exceso de base sanguíneo .....	156



<b>Tabla 34:</b> Valores medios y desviación típica del <i>anion GAP</i> (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	156
<b>Tabla 35:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre el <i>anion GAP</i> .....	157
<b>Tabla 36:</b> Valores medios y desviación típica de la DIFaproximada (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	158
<b>Tabla 37:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la diferencia de iones fuertes aproximada.....	159
<b>Tabla 38:</b> Valores medios y desviación típica de las variaciones del agua libre (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	160
<b>Tabla 39:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre las variaciones del agua libre .....	160
<b>Tabla 40:</b> Valores medios y desviación típica de las variaciones de cloro corregido (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	161
<b>Tabla 41:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre las variaciones del cloro corregido .....	161
<b>Tabla 42:</b> Valores medios y desviación típica de las variaciones en los aniones no medibles (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	162
<b>Tabla 43:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre las variaciones aniones no medibles.....	163
<b>Tabla 44:</b> Valores medios y desviación típica de las variaciones de albúmina (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	163
<b>Tabla 45:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre las variaciones de la albúmina.....	163
<b>Tabla 46:</b> Valores medios y desviación típica de las variaciones de fósforo (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	164

<b>Tabla 47:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre las variaciones del fósforo.....	164
<b>Tabla 48:</b> Valores medios y desviación típica del pH urinario para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	166
<b>Tabla 49:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre el pH urinario .....	166
<b>Tabla 50:</b> Valores medios y desviación típica de las concentraciones de sodio (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	168
<b>Tabla 51:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de sodio .....	168
<b>Tabla 52:</b> Valores medios y desviación típica de las concentraciones de potasio (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo.....	169
<b>Tabla 53:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de potasio .....	169
<b>Tabla 54:</b> Valores medios y desviación típica de las concentraciones de cloro (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	170
<b>Tabla 55:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de cloro.....	171
<b>Tabla 56:</b> Valores medios y desviación típica de las concentraciones de calcio iónico (mmol/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo.....	173
<b>Tabla 57:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de calcio iónico .....	173
<b>Tabla 58:</b> Valores medios y desviación típica de las concentraciones de calcio total (mg/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo.....	174
<b>Tabla 59:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de calcio total.....	175

<b>Tabla 60:</b> Valores medios y desviación típica de las concentraciones de fósforo (mg/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	175
<b>Tabla 61:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de fósforo .....	175
<b>Tabla 62:</b> Valores medios y desviación típica de las concentraciones de magnesio (mg/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	176
<b>Tabla 63:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de magnesio.....	176
<b>Tabla 64:</b> Valores medios y desviación típica del valor hematocrito (%) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	177
<b>Tabla 65:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre el valor hematocrito .....	178
<b>Tabla 66:</b> Valores medios y desviación típica de las concentraciones de hemoglobina (g/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. ....	179
<b>Tabla 67:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de hemoglobina.....	179
<b>Tabla 68:</b> Valores medios y desviación típica de las concentraciones de glucosa (mg/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	180
<b>Tabla 69:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de glucosa.....	181
<b>Tabla 70:</b> Valores medios y desviación típica de las concentraciones de proteínas totales (g/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	182
<b>Tabla 71:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de proteínas totales.....	182
<b>Tabla 72:</b> Valores medios y desviación típica de las concentraciones de albúmina (g/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	183

<b>Tabla 73:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de albúmina .....	183
<b>Tabla 74:</b> Valores medios y desviación típica de las concentraciones de urea (mg/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	184
<b>Tabla 75:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de urea .....	184
<b>Tabla 76:</b> Valores medios y desviación típica de las concentraciones de creatinina (mg/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo.....	185
<b>Tabla 77:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de creatinina .....	185
<b>Tabla 78:</b> Valores medios y desviación típica de las concentraciones de cortisol sérico (µg/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo.....	186
<b>Tabla 79:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración sérica de cortisol.....	187
<b>Tabla 80:</b> Valores medios y desviación típica de las concentraciones de telopéptido carboxiterminal de colágeno tipo I (µg/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo.....	188
<b>Tabla 81:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de TCTI.....	189
<b>Tabla 82:</b> Valores medios y desviación típica de las concentraciones de fosfatasa alcalina de origen óseo (U/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo .....	190
<b>Tabla 83:</b> Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la actividad de la FAO .....	190

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribución de las diferentes fracciones de calcio .....	27
<b>Figura 2:</b> Degradación y depuración de la PTH.....	32
<b>Figura 3:</b> Principales metabolitos de la vitamina D .....	37
<b>Figura 4:</b> Metabolismo de la vitamina D.....	38
<b>Figura 5:</b> Diagrama general en el que se describen la influencia de minerales y hormonas sobre el metabolismo de la vitamina D <sub>3</sub> con sus efectos sobre los principales órganos diana.....	40
<b>Figura 6:</b> Estructura de un hueso largo típico .....	59
<b>Figura 7:</b> Diagrama de un hueso compacto en sección .....	66
<b>Figura 8:</b> Cantidad de cationes y aniones urinarios excretados en cerdos alimentados con una dieta acidogénica (-35 mEq/kg), control (112 mEq/kg) y alcalinogénica (212 mEq/kg) .....	105
<b>Figura 9:</b> (A) Actividad de la fosfatasa ácida resistente a tartrato en los osteoclastos de la superficie endosteal; (B) Actividad de la fosfatasa alcalina en los osteoblastos del periostio.....	115



## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1:</b> Representación del pH sanguíneo respecto al tiempo para cada una de las tres dietas.....	151
<b>Gráfica 2:</b> Representación de la $p\text{CO}_2$ (mmHg) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas .....	152
<b>Gráfica 3:</b> Representación de la concentración de bicarbonato (mEq/L) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas .....	154
<b>Gráfica 4:</b> Representación de la DIFaproximada (mEq/L) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas .....	159
<b>Gráfica 5:</b> Representación de las variaciones del cloro corregido (mEq/L) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas .....	162
<b>Gráfica 6:</b> Representación del pH urinario respecto al tiempo para cada una de las tres dietas.....	167
<b>Gráfica 7:</b> Representación de la concentración de potasio (mEq/L) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas .....	170
<b>Gráfica 8:</b> Representación de la concentración de cloro (mEq/L) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas .....	171
<b>Gráfica 9:</b> Representación de la concentración de calcio iónico (mmol/L) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas .....	174
<b>Gráfica 10:</b> Representación del valor hematocrito (%) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas .....	178
<b>Gráfica 11:</b> Representación de la concentración de glucosa (mg/dl) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas .....	181
<b>Gráfica 12:</b> Representación de la concentración del cortisol sérico ( $\mu\text{g/dl}$ ) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas .....	187
<b>Gráfica 13:</b> Representación de la concentración de TCTI ( $\mu\text{g/L}$ ) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas .....	189





## Introducción y Justificación



## 1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

En los últimos años, o tal vez sería más correcto decir en las últimas décadas, los cuidados y atenciones que disfrutaban los animales de compañía en general y los perros en particular difieren notablemente de las condiciones de vida en tiempos pasados.

Esta evolución en los cuidados proporcionados a los animales de compañía alcanza a los aspectos sanitarios y al manejo, pero sobre todo se hacen patentes en la forma de alimentación. Si bien tradicionalmente los cánidos, tal vez desde el inicio de su domesticación, se alimentaron de los restos y subproductos de la alimentación humana, incrementados por materiales de diversa índole que el propio animal recogía esporádicamente en el medio, en la actualidad este hecho ha cambiado drásticamente. Así hoy en día la tendencia es a administrar dietas comerciales tecnológicamente preparadas para alimentar de forma correcta a los animales a base de piensos secos que se administran, la mayoría de las veces, en función a su peso, suplementados de cuando en cuando con “golosinas” o también con pequeñas porciones de la dieta del propio dueño.

Las circunstancias anteriormente descritas justifican el hecho de que actualmente existan gran variedad de dietas comercializadas para los animales de compañía. La gran oferta de alimentos de origen comercial para perros y su repercusión potencial sobre el bienestar de los animales hacen comprensible que sus características, beneficios, aplicaciones y efectos sean altamente relevantes para los veterinarios e investigadores; dado que una buena dieta de mantenimiento, así como aquellas formuladas específicamente para la prevención y tratamiento de enfermedades, son herramientas auxiliares importantes en la práctica clínica veterinaria diaria.

En la actualidad existe una importante cantidad de documentación científica referente a la nutrición canina, pero en toda esta información se le ha brindado muy poca atención a la composición mineral de las raciones y sus efectos metabólicos. En la formulación de las dietas caninas es una práctica común, incluir todos los minerales que son necesarios para otros mamíferos, aunque los requerimientos cuantitativos de los mismos no hayan sido establecidos experimentalmente para perros. Por lo tanto, las concentraciones de los minerales empleadas en las dietas para perros están basadas generalmente en estimaciones

extrapoladas de las necesidades de otras especies, sin considerar las particularidades fisiológicas y etológicas de las mascotas.

La mayoría de los expertos nutricionistas coinciden en la premisa de que el estudio de los minerales nunca debe realizarse de forma única, puesto que presentan un alto grado de interacción entre sí. Basándose en este concepto, ya hace más de 2 décadas que se comenzó a emplear el término diferencia electrolítica de la dieta (DED) sobre todo en relación con las disciplinas de nutrición y producción animal. El primer investigador que propuso este término y que lo definió como la suma del sodio y del potasio menos el cloro presentes en el alimento (todos ellos expresados en mEq/kg de MS) fue Mongin (1980, 1981) en el caso concreto de las aves, aunque este investigador ya basó sus estudios en los trabajos previos de Ender *et al.* (1971) en rumiantes.

A partir de entonces, han sido numerosos los investigadores que han empleado dicha ecuación con el fin de mejorar diferentes aspectos en la producción y bienestar animal. De modo que durante los últimos años se han venido utilizado modificaciones en la DED para la prevención de patologías muy dispares como de la discondroplasia tibial en pollos, la paresia puerperal en ganado vacuno, optimizar el rendimiento cárnico en avicultura y ganado porcino, y para incrementar la calidad del huevo en gallinas ponedoras.

En los diferentes trabajos de investigación llevados a cabo aplicando modificaciones de la DED, en diferentes especies, se ha comprobado que este parámetro puede estar relacionado con la aparición de modificaciones en el metabolismo óseo y sobre la excreción de minerales en orina. Actualmente se cree que la mayoría de los efectos orgánicos que se hacen evidentes a través de modificaciones en la DED se deben a la influencia que ejerce la modificación de los minerales presentes en dicha fórmula sobre el equilibrio ácido-básico del organismo. La importancia de la composición mineral de la ración en el metabolismo ácido-base ha sido estudiada en medicina humana durante más de treinta años y de forma más reciente ha comenzado a estudiarse en veterinaria, fundamentalmente en animales de abasto.

El equipo investigador en el que me encuentro integrada actualmente, en el pasado ha realizado importantes investigaciones en la aplicación de diferentes DED en la dieta ovina y sus repercusiones sobre la morfología ósea, siendo dichos trabajos los que nos condujeron a considerar el hecho de que este tema ha sido muy poco tratado en perros y, que de igual forma a lo que acontece en otras especies, es probable que la administración de dietas con diferente DED pueda conducir a modificaciones del metabolismo óseo y mineral.

Hasta la fecha los estudios sobre nutrición canina han prestado poca atención a los requerimientos dietéticos de sodio, potasio y cloro, considerando generalmente sólo el estudio de los electrolitos con el fin de determinar sus requerimientos mínimos para formular la dieta con un margen de seguridad. Además no se han tenido en cuenta o se ha hecho de forma muy poco precisa las interacciones con otros aniones y cationes. En especie canina el único estudio con el que contamos, aplicando el concepto de diferencia electrolítica de la dieta, fue elaborado por Kealy *et al.* (1993), con el fin de intentar encontrar una relación de la alimentación con la subluxación de cadera.

En el momento en el que nos planteamos el presente trabajo, decidimos realizar un análisis previo de varios de los principales piensos fisiológicos comercializados en España para el mantenimiento del animal adulto y verificamos que se están distribuyendo dietas que presentan DED muy dispares para estados fisiológicos similares. Este hecho hace que nos podamos hacer una idea del gran vacío que existe, en pequeños animales, en lo que respecta a la composición en minerales de la dieta, ya que no existen trabajos en los que se haya investigado cual sería la DED más apropiada para los diferentes estados tanto fisiológicos como patológicos en pequeños animales.

Teniendo en cuenta las premisas mencionadas hasta este momento y basándonos en los resultados de los trabajos realizados en otras especies, podemos suponer que las variaciones de la DED podrían desencadenar cambios a nivel del equilibrio ácido-base orgánico, en la homeostasis de los diferentes minerales, e incluso, como ya hemos mencionado, podrían producirse alteraciones a nivel de metabolismo óseo. Demostrar todos estos hechos supondría un importante avance en nutrición canina, puesto que permitiría conocer cual es la DED más adecuada para las dietas fisiológicas de mantenimiento en los diferentes estadios de vida del animal, así como la elaboración de dietas coadyuvantes a otro tipo de tratamientos en determinadas patologías, entre las que se podrían incluir procesos morbosos que afecten al hueso (fracturas, osteomielitis, panosteítis, patologías del crecimiento, tumores óseos primarios y enfermedad metastásica ósea). También podría resultar de interés el estudio de esta estrategia dietética sobre la prevención de determinados tipos de urolitiasis canina, debido a su posible efecto sobre la excreción de minerales a través de la orina y sobre el pH urinario.



Objetivos





## 2. OBJETIVOS

Esta memoria de tesis doctoral ha sido diseñada con el fin de dar respuesta a los siguientes objetivos tomando como modelo experimental el perro:

1. Evaluar las variaciones en la homeostasis ácido-base asociadas a la ingesta de raciones con una DED diferente.
2. Estudiar las posibles repercusiones de la DED sobre las concentraciones plasmáticas de los principales minerales (sodio, potasio, cloro, calcio, fósforo y magnesio) y otros parámetros bioquímicos que reflejen el estado metabólico.
3. Considerar el efecto de la administración de dichas dietas sobre la producción de cortisol por parte de la glándula adrenal.
4. Valorar las repercusiones de las modificaciones de la DED sobre el metabolismo óseo a través del estudio de marcadores de la formación y de la resorción ósea.



## Revisión Bibliográfica



### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BÁSICO

Comenzaremos esta memoria realizando una breve introducción sobre la fisiología del equilibrio ácido-básico, el pretender realizar un análisis profundo de este tema resultaría imposible debido a su gran extensión. Con el resumen que a continuación exponemos sólo queremos poner de manifiesto unas nociones fundamentales que nos ayuden a comprender nuestro estudio posterior.

Debemos comenzar explicando que cuando hablamos de regulación del equilibrio ácido-básico nos referimos en realidad a la regulación de la concentración de hidrogeniones en los fluidos corporales. Así, pequeños cambios en la concentración de iones hidrógeno pueden producir grandes alteraciones en el funcionamiento enzimático, en la incorporación y regulación celular de metabolitos y de minerales, en la conformación de los componentes estructurales y biológicos, así como en la captación y liberación de oxígeno. Por este motivo la regulación de la concentración de hidrógeno es uno de los aspectos más importantes de la homeostasis (Prieto *et al.*, 2001).

En un animal sano, cualquier perturbación en el pH de su sangre arterial desencadena la actuación de los sistemas tampones existentes en el medio interno, estos sumados a la acción de las respuestas compensatorias respiratorias y renales, actúan para mantener la concentración sanguínea de ión hidrógeno, de modo que cuando la actividad de alguno de estos mecanismos está comprometida aparecen disturbios en el equilibrio ácido-básico (Russell *et al.*, 1996). De estos tres tipos de mecanismos compensadores trataremos de forma más extensa en el apartado de “efectos de la diferencia electrolítica de la dieta sobre el equilibrio ácido-básico”.

Podemos valorar los desequilibrios que aparecen en el estado ácido-base de dos formas, por un lado contamos con el método tradicional, basado en la aplicación de los principios de la ecuación de Henderson-Hasselbalch, y por otro tenemos el complejo método cuantitativo que se basa en la “teoría de los iones fuertes” elaborada por Stewart (1983).

En la tabla 1 recordamos unas nociones básicas con el fin de facilitar la comprensión de esta primera parte.

DEFINICIONES Y CONCEPTOS BÁSICOS	
<p><b>Acidemia:</b> Consiste en una disminución del pH sanguíneo por debajo de lo normal. En perros, se considera que existe acidemia con valores por debajo de 7,31.</p> <p><b>Alcalemia:</b> Es un incremento del pH sanguíneo por encima del rango normal. En perros, se considera que existe alcalemia cuando el pH sanguíneo es mayor de 7,42.</p> <p><b>Acidosis:</b> Este término se refiere a un proceso que causa la acumulación de ácido. Aunque el pH sanguíneo tiende a disminuir cuando hay acidosis, este término no implica que existan anomalías del pH sanguíneo.</p> <p><b>Alcalosis:</b> Este término se aplica a un proceso que cursa con acumulación de bases. Aunque el pH tiende a aumentar en situaciones de alcalosis, esto no implica la aparición de anomalías en el pH sanguíneo.</p> <p><b>Acidosis metabólica:</b> Es un proceso que provoca la acumulación de ácidos no-volátiles en el organismo. Se caracteriza por la disminución de la concentración de bicarbonato en el líquido extracelular (LEC).</p> <p><b>Alcalosis metabólica:</b> Es un proceso que cursa con la acumulación de álcalis (normalmente bicarbonato) en el cuerpo. Se caracteriza por el aumento de la concentración de bicarbonato en el LEC.</p> <p><b>Acidosis respiratoria:</b> Hace referencia a procesos que cursan con acúmulo de CO<sub>2</sub> en el organismo y son detectados por el aumento de la concentración de dióxido de carbono sanguínea (pCO<sub>2</sub>).</p>	<p><b>Alcalosis respiratoria:</b> Hace referencia a procesos que causan un aumento de la eliminación de CO<sub>2</sub>, y son detectados por una disminución de PCO<sub>2</sub>.</p> <p><b>Ácidos volátiles:</b> Son aquellos que pueden ser eliminados del organismo a través de los pulmones (ej. ácido carbónico).</p> <p><b>Ácidos no volátiles:</b> Son aquellos que no pueden ser eliminados del organismo a través de los pulmones y deben ser excretados por los riñones.</p> <p><b>Ácidos orgánicos:</b> Son ácidos no volátiles que contienen carbono (ej. ácido láctico, ácido beta-hidroxibutírico).</p> <p><b>Tampón:</b> Es una sustancia que cuando está presente en una solución amortigua los cambios de concentración del ión hidrógeno cuando un ácido o una base es añadida a dicha solución.</p> <p><b>CO<sub>2</sub>t:</b> Es la cantidad de gas CO<sub>2</sub> que puede ser extraído del plasma y está compuesto de bicarbonato, ácido carbónico y dióxido de carbono.</p> <p><b>Anion GAP:</b> Se define como la diferencia en las concentraciones séricas de cationes medibles (sodio y potasio) y las concentraciones séricas de aniones medibles (cloro y bicarbonato).</p> <p><b>Exceso de bases (EB):</b> Número de mEq de un ácido o base necesarios para titular 1 L de sangre a pH de 7,4 en condiciones de 37°C de temperatura y con una PCO<sub>2</sub> constante de 40 mmHg. El EB cambia únicamente por ácidos no volátiles o fijos y por tanto se considera que refleja perturbaciones ácido-básicas metabólicas.</p>

**Tabla 1:** Definiciones y conceptos (Polzin *et al.*, 1982; Russell *et al.*, 1996)

### 3.1.1. PROCEDIMIENTO TRADICIONAL PARA LA VALORACIÓN DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BÁSICO

El método tradicional empleado para valorar el estado ácido-básico se centra en cómo interactúa la presión de dióxido de carbono ( $p\text{CO}_2$ ), la concentración de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), el logaritmo negativo de la constante de equilibrio ( $pK_1$ ) y la solubilidad del  $\text{CO}_2$  en el plasma, para determinar el pH plasmático. La relación entre estos factores se expresa comúnmente como la ecuación de Henderson-Hasselbalch (Constable, 1999):

$$\text{pH} = pK_1 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = pK_1 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{\alpha p\text{CO}_2}$$

Aunque cuantitativamente la hemoglobina es el sistema tampón más importante presente en la sangre, el sistema ácido carbónico-bicarbonato presenta un papel central en el mantenimiento del equilibrio ácido-básico debido a su enorme capacidad para realizar ajustes rápidos. En la ecuación anterior la concentración de  $\text{H}_2\text{CO}_3$  puede reemplazarse por  $\alpha p\text{CO}_2$ , siendo  $\alpha$  el coeficiente de disociación del dióxido de carbono (0,03). De modo que el pH sanguíneo es función del cociente entre la concentración de bicarbonato y la presión parcial de dióxido de carbono (Robertson, 1989).

Según la ecuación que acabamos de ver, aumentos o disminuciones en la  $p\text{CO}_2$  producen acidosis o alcalosis respiratoria respectivamente; mientras alteraciones en las concentraciones de bicarbonato ponen de manifiesto desequilibrios ácido-básicos metabólicos. Teniendo en cuenta esto se describen cuatro tipos de disturbios ácido-básicos simples: acidosis metabólica, alcalosis metabólica, acidosis respiratoria y alcalosis respiratoria (Robertson *et al.*, 1989).

En las tablas 2 y 3 exponemos los valores medios descritos por diferentes autores para el pH,  $p\text{CO}_2$  y  $\text{HCO}_3^-$  en muestras de sangre arterial en perros. En la primera de ellas podemos observar el intervalo dentro del cual los valores obtenidos son considerados como normales, y en la segunda los resultados encontrados por diferentes autores en sus estudios realizados en perros.

AUTORES	pH	pCO <sub>2</sub> (mmHg)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mEq/L)
Robertson (1989)	7,36-7,44	36-44	24-26
Bailey y Pablo (1998)	7,35-7,45	35-45	18-26
DiBartola (2002)	7,351-7,463	30,8-42,8	18,8-25,6

**Tabla 2:** Intervalos de referencia para el pH, pCO<sub>2</sub> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en perros

AUTORES	pH	pCO <sub>2</sub> (mmHg)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mEq/L)
Ilkiw <i>et al.</i> (1991)	7,395±0,028	36,82±2,7	21,4±1,6
Aguilera-Tejero (1997) y Estepa <i>et al.</i> (1999b)	7,399±0,009	34,9±1,3	20,5±0,6

**Tabla 3:** Valores medios y desviación estándar obtenidos para el pH, pCO<sub>2</sub> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> por diferentes investigadores para el perro

Además de los cuatro tipos de alteraciones ácido-básicas simples que acabamos de mencionar, también pueden existir desórdenes ácido-básicos mixtos; dichos procesos aparecen cuando dos alteraciones que afectan al equilibrio ácido-base se presentan de forma concurrente en el mismo paciente. Pueden sospecharse de su existencia en varias situaciones (Espino *et al.*, 2001):

- Cuando el pH es normal y los valores de pCO<sub>2</sub> y/o bicarbonato están modificados.
- Cuando el pH varía en el sentido contrario al esperado para la patología que se ha diagnosticado.
- Cuando la pCO<sub>2</sub> y el bicarbonato varían en sentidos diferentes, debido a que en las alteraciones ácido-básicas donde hay compensación siempre varían en la misma dirección.
- Cuando la compensación esperada para un proceso primario no es completa.

Esta valoración tradicional se puede completar con otros parámetros, entre los que destaca el “exceso de bases” y el “*anion GAP*”, para identificar de forma más precisa la alteración presente sobre todo cuando se trata de desórdenes mixtos.

En la página siguiente observamos una tabla de consulta rápida que nos puede ayudar a interpretar los disturbios ácido-básicos según el método tradicional, en ella podemos ver como en algunos casos concretos es necesario recurrir al cálculo del *anion GAP* para realizar una valoración correcta.



pH	pCO <sub>2</sub>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	INTERPRETACIÓN
↓	↓	↓	Acidosis metabólica con compensación respiratoria parcial.
		Normal	Posible error. Volver a realizar los análisis.
		↑	Posible error. Volver a realizar los análisis.
	Normal	↓	Acidosis metabólica y respiratoria.
		Normal	Posible error. Volver a realizar el análisis.
		↑	Posible error. Volver a realizar el análisis.
	↑	↓	Acidosis respiratoria y metabólica.
		Normal	Acidosis respiratoria.
		↑	Acidosis respiratoria con compensación metabólica parcial o trastorno mixto alcalosis metabólica más acidosis respiratoria.
Normal	↓	↓	Acidosis metabólica con compensación respiratoria completa o alcalosis respiratoria con compensación metabólica completa.
		Normal	Posible error. Volver a realizar el análisis.
		↑	Posible error. Volver a realizar el análisis.
	Normal	↓	Posible error. Volver a realizar el análisis.
		Normal	Normal. Medir "anion GAP" si se considera necesario por la historia clínica.
		↑	Posible error. Volver a realizar el análisis.
	↑	↓	Posible error. Volver a realizar el análisis.
		Normal	Posible error. Volver a realizar el análisis.
		↑	Alcalosis respiratoria con compensación metabólica completa o alcalosis metabólica con compensación respiratoria completa.
↑	↓	↓	Alcalosis respiratoria con compensación metabólica parcial o trastorno mixto acidosis metabólica más alcalosis respiratoria.
		Normal	Alcalosis respiratoria.
		↑	Alcalosis respiratoria y metabólica.
	Normal	↓	Posible error. Volver a realizar el análisis.
		Normal	Posible error. Volver a realizar el análisis.
		↑	Alcalosis metabólica.
	↑	↓	Posible error. Volver a realizar el análisis.
		Normal	Posible error. Volver a realizar el análisis.
		↑	Alcalosis metabólica con compensación respiratoria parcial.

**Tabla 4:** Valoración del estado ácido-básico. Interpretación de las variables de pH, pCO<sub>2</sub> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Espino *et al.*, 2001)

### 3.1.1.1. EXCESO DE BASES (EB)

La evaluación convencional de los disturbios ácido-básicos no respiratorios incluye además del análisis de la ecuación de Henderson-Hasselbalch el concepto de exceso de base (EB). Este concepto se define como “el número de miliequivalentes de un ácido o base requerido para titular 1 litro de sangre a un pH de 7,4 a 37 °C con una pCO<sub>2</sub> constante de 40 mmHg”. Este parámetro es calculado a partir de los valores de pH, de pCO<sub>2</sub> y de hemoglobina, o a partir del monograma de Siggaard-Anderson (Russell *et al.*, 1996). El EB cambia únicamente por ácidos no volátiles o fijos y por tanto se considera que refleja perturbaciones ácido-básicas metabólicas (DiBartola, 2002), de modo que grandes incrementos en el EB indican una contribución no respiratoria a la alcalosis, mientras que grandes disminuciones del EB reflejan una contribución no respiratoria a la acidosis (Russell *et al.*, 1996).

Los valores normales descritos para el perro se encuentran en el intervalo comprendido entre 0 ± 4 (Robertson, 1989; Bailey y Pablo, 1998; DiBartola, 2002), aunque Constable *et al.* (2000) consideran un intervalo ligeramente más amplio (-6, +6). Otros autores aunque han encontrado unos valores para el EB dentro de este amplio rango describen una media para este parámetro ligeramente inferior.

En la tabla que exponemos a continuación aparecen los valores medios y la desviación estándar del EB obtenidos en diferentes trabajos realizados con sangre arterial canina.

AUTOR	EB (media±DE)
Ilkiw <i>et al.</i> (1991)	-1,8±1,6
Aguilera-Tejero <i>et al.</i> (1997)	-2,78±0,45
Estepa <i>et al.</i> (1999b)	

**Tabla 5:** Resultados de EB en mEq/L (media ± DE) encontrados por diferentes autores

### 3.1.1.2. ANION GAP

El *anion GAP* se define como la diferencia entre las concentraciones de cationes séricos medibles (sodio y potasio) y las concentraciones de aniones séricos medibles (cloruro y bicarbonato), de modo que el *anion GAP* viene definido por la siguiente ecuación (Polzin *et al.*, 1982):

$$AG = (Na^{+} + K^{+}) - (Cl^{-} + HCO_{3}^{-})$$

Teniendo en cuenta que el número de moles de partículas con carga positiva (cationes) en cualquier solución debe ser igual al número de moles de partículas con carga negativa (aniones) presentes en la misma:  $n^{\circ}$  cationes =  $n^{\circ}$  aniones según la teoría de Stewart (1983), se debe cumplir la siguiente ecuación:

$$\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{CNM} = \text{Cl}^- + \text{HCO}_3^- + \text{ANM}$$

CNM: cationes no medibles

ANM: aniones no medibles

Reordenando estas dos ecuaciones podemos ver como el *anion GAP* está determinado por la diferencia entre las concentraciones de aniones no medibles y las concentraciones de cationes no medibles.

$$(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-) = \text{ANM} - \text{CNM}$$

$$\text{GAP} = \text{ANM} - \text{CNM}$$

Los cationes no medibles incluyen el calcio, magnesio y gamma globulinas. Los aniones no medibles incluyen el fosfato, sulfato y aniones orgánicos (lactato, piruvato, alfa y beta-globulinas y albúmina). El aumento de los aniones no medibles provoca la elevación del *anión GAP*, su incremento también estaría motivado por una disminución de los cationes no medibles, pero el descenso de estos cationes tendría que ser de tal cuantía que resultaría incompatible con la vida (Polzin *et al.*, 1982). Pueden aparecer disminuciones del *anion GAP* en situaciones de hipoalbuminemia o hemodilución (Russell *et al.*, 1996).

En cuanto a los valores normales en perros en lo que respecta a este parámetro hemos podido reunir la siguiente información: en un estudio realizado por Shull (1978) en 150 perros sanos el rango normal se situó entre 15 y 25 mEq/L; Adroque *et al.* en este mismo año realizando un estudio en 80 perros fijaron el intervalo normal entre 14 y 23 mEq/L, mientras que Polzin *et al.* (1982) ampliaron ligeramente estos datos considerando como normales los valores comprendidos entre 12 y 24 mEq/L.

La utilidad del *anion GAP* reside en que nos facilita la localización de la causa de la acidosis metabólica, puesto que hay causas de acidosis que cursan con un aumento del *anion GAP* y otras que son hiperclorémicas. Por ejemplo, en el caso de la administración de agentes

acidificantes que contienen cloro, el *anion GAP* es normal y la acidosis tiende a ser hiperclorémica, esto ocurre porque el bicarbonato tiende a disminuir para compensar el incremento del ión cloruro. Este tipo de acidosis puede estar asociada, además, con hipercalcemia, normocalcemia o, incluso, con hipocalcemia (Polzin *et al.*, 1982; Magner *et al.*, 1988).

Cuando el *anion GAP* aumenta, que es lo más habitual, está indicando que existe una acidosis metabólica producida por un aumento de los ácidos orgánicos (láctico, cuerpos cetónicos, acetilsalicílico, oxálico, urea), ya que al aumentar estos ácidos aumentan los aniones no medibles (Grauss y Martínez, 2007).

CAUSAS DE ACIDOSIS METABÓLICA	
Acidosis con elevación del anión GAP	Acidosis hiperclorémicas
Uremia	Diarrea <sup>a</sup>
Cetoacidosis	Causas renales:
Coma hiperglucémico no cetoacidótico	- Fallo renal agudo
Acidosis láctica	- Acidosis tubular renal:
Toxicidad:	o Distal <sup>a</sup>
- Etilenglicol	o Proximal <sup>a</sup>
- Metanol	Fármacos:
- Salicilato	- Inhibidores de la anhidrasa carbónica <sup>a</sup>
- Paraldehído	- Agentes acidificantes:
	o NH <sub>4</sub> Cl
	o CaCl <sub>2</sub> oral
	o Sulfato de metionina
	Sobrealimentación
	Desvío uretral al colon <sup>a</sup>
	Hidratación IV rápida
	Toxicidad por sulfuros
	Cetoacidosis con pérdida renal de cetonas

<sup>a</sup> Además de acidosis hiperclorémica normalmente cursan también con hipocalcemia

**Tabla 6:** Clasificación de las causas de acidosis metabólica (Polzin *et al.*, 1982)

### 3.1.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE

Descontentos con la capacidad de la ecuación de Henderson-Hasselbalch para describir de forma precisa los desequilibrios en el balance ácido-básico, Singer y Hastings propusieron en 1948 que el pH plasmático está determinado por dos factores independientes, la  $p\text{CO}_2$  y la carga neta de iones fuertes que es equivalente a la diferencia de iones fuertes (DIF). Más tarde, Stewart (1978, 1983) sugirió una tercera variable, la concentración de tampones débiles no volátiles ( $A_{\text{TOT}}$ ) que son la albúmina, globulinas y fosfato. De este modo, la concentración de todas las variables dependientes, entre las que se encuentran la concentración de bicarbonato y la de ión hidrógeno, depende de las variables independientes mencionadas, siendo esta la premisa más innovadora propuesta por Stewart, puesto que era totalmente contraria a lo que se creía hasta ese momento (Russell *et al.*, 1996).

La DIF cambia si varía la diferencia entre la suma de los cationes fuertes y la suma de las cargas de los aniones fuertes. Los iones se consideran fuertes si están disociados casi completamente al pH de los líquidos corporales. Los cationes fuertes son sodio, potasio, calcio y magnesio. De estos, sólo el sodio está presente en concentraciones suficientemente altas en el líquido extracelular de forma tal que es probable que un cambio en su concentración tenga un efecto sustancial en la DIF. Los aniones fuertes son el cloruro y varios otros que no se miden clínicamente de forma regular y se conocen genéricamente como aniones fuertes no medibles (lactato, acetoacetato,  $\beta$ -hidroxibutirato, sulfato). El cloruro y algunos otros aniones fuertes pueden alterarse en un grado suficiente para ejercer un efecto sustancial sobre la DIF (DiBartola *et al.*, 2002).

Los principales aniones débiles del LEC son el bicarbonato, las proteínas plasmáticas y el fosfato. De estos, las proteínas plasmáticas y el fosfato constituyen la variable independiente  $A_{\text{TOT}}$ , mientras que el bicarbonato es una variable dependiente (DiBartola *et al.*, 2002).

La principal limitación del modelo propuesto por Stewart es la dificultad para obtener un valor preciso de la DIF, ya que requiere la identificación y medida de todos los iones fuertes en el plasma, tales como lactato,  $\beta$ -hidroxibutirato, acetoacetato, sulfato, calcio y magnesio. Por este motivo con el paso del tiempo se han ido realizando simplificaciones de este modelo (Constable *et al.*, 1997; Constable *et al.*, 1999).

Es necesario resaltar que en contraste con la ecuación de Henderson-Hasselbalch el método cuantitativo caracteriza 6 trastornos ácido-básicos primarios: acidosis y alcalosis respiratoria,

acidosis y alcalosis por alteraciones de los iones fuertes y, por último, acidosis y alcalosis en relación con los tampones no volátiles (Constable 2000; Constable y Stäpfli, 2005).

Antes de continuar con las fórmulas que han empleado diferentes autores para el análisis de la diferencia de iones fuertes en pequeños animales, hay que señalar que la aproximación de los iones fuertes de Stewart (1983) no es para nada incompatible con el método tradicional basado en la ecuación de Henderson-Hasselbalch, sino que son diferentes maneras de analizar el mismo fenómeno fisiológico, de modo que el método cuantitativo no debe sustituir al tradicional sino que debe complementarlo (De Moraes, 2005).

A continuación ofrecemos un resumen de las fórmulas empleadas con más frecuencia para el análisis cuantitativo del equilibrio ácido-básico, es necesario destacar que no son las únicas pero que son las más aplicables desde el punto de vista clínico debido a su relativa simplicidad:

- Figge *et al.* (1992) propusieron una fórmula para el cálculo de la DIF aparente que contempla el uso de las concentraciones de todos los iones fuertes que se pueden medir rutinariamente en los laboratorios clínicos.

$$\begin{aligned} \text{DIF}_{\text{aparente}} &= (\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}) - \text{Cl}^- \\ \text{DIF}_{\text{efectiva}} &= \text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} - \text{Cl}^- - \text{XA}^- \end{aligned}$$

Todas las concentraciones en mEq/L

El término  $\text{XA}^-$  representa las concentraciones de aniones fuertes no medibles

La  $\text{DIF}_{\text{efectiva}}$  incluye al bicarbonato, a las proteínas y al fosfato de modo que:

$$\text{DIF}_{\text{efectiva}} = \text{Bicarbonato} + \text{CP}_{\text{tot}} + \text{CPi}$$

$\text{CP}_{\text{tot}}$  = contribución de las proteínas totales

$\text{CPi}$  = contribución del fosfato inorgánico

Para calcular la contribución de las proteínas y de los fosfatos Figge *et al.* (1992) emplearon las siguientes fórmulas:

$$\text{Proteínas (mEq/L)} = 10 \times \text{albúmina (sérica)} \times (0,123 \times \text{pH} - 0,631)$$

$$\text{Fosfato (mEq/L)} = \text{fosfato (mmol/L)} \times (0,309 \times \text{pH} - 0,469)$$

De modo que:

$$\text{XA}^- = \text{DIF}_{\text{aparente}} - \text{DIF}_{\text{efectiva}}$$

▪ Aguilera-Tejero *et al.* (1997) y Estepa *et al.* (1999b) son los únicos investigadores españoles que han empleado el método cuantitativo de análisis del equilibrio ácido-básico en perros, estos autores han utilizado el método descrito por Fencel y Leith (1993), que hace uso de las siguientes fórmulas:

$$\text{DIF}_{\text{aparente}} = (\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Ca}^{2+}) - \text{Cl}^-$$

$$\text{DIF}_{\text{efectiva}} = \text{Bicarbonato} + \text{CP}_{\text{tot}} + \text{CPi}$$

Donde:

$$\text{CP}_{\text{tot}} = 0,47 \text{ P}_{\text{tot}} (1,23 \times \text{pH} - 6,31)$$

$$\text{CPi} = \text{Pi (mg/dl)} (0,309 \times \text{pH} - 0,469) \times 10 / 30,97$$

$$\text{AX}^- = \text{DIF}_{\text{aparente}} - \text{DIF}_{\text{efectiva}}$$

PARÁMETRO	VALOR	UNIDADES
DIF <sub>aparente</sub>	41,2±0,9	mEq/L
DIF <sub>efectiva</sub>	31,1±0,6	mEq/L
AX	9,5±1,0	mEq/L

**Tabla 7:** Valores de referencia para parámetros del método cuantitativo en perros propuestos por Estepa *et al.* (1999)

▪ Russell *et al.* (1996) y Bailey y Pablo (1998) proponen el uso de fórmulas que han sido extrapoladas de los estudios publicados por Leith (1991) y de Morais (1992). Vamos a dividir la exposición de las mismas en tres bloques para facilitar su comprensión, cada uno

comprenderá el estudio de una de las variables independientes que pueden modificar el equilibrio ácido-básico.

### Bloque I: DIF

$$DIF_{aproximada} = [Na^{+}_{media\ normal}] - [Cl^{-}_{corregido}]$$

$$Cl^{-}_{corregido} = Cl^{-}_{paciente} \times (Na^{+}_{media\ normal} / Na^{+}_{paciente})$$

Todas las concentraciones han de expresarse en mEq/L

Se considera que incrementos de la DIF aproximada sugiere la presencia de alcalosis no respiratoria mientras que sus disminuciones son compatibles con acidosis no respiratoria.

Las tres vías principales por las cuales puede modificarse la DIF son: por cambios en el contenido en agua, por cambios en el Cl corregido y por cambios en la concentración de ácidos aniones fuertes no medibles.

#### 1) Cambios en el agua libre:

$$\Delta \text{ Agua libre} = Z(Na^{+}_{paciente} - Na^{+}_{media\ normal})$$

$$Z = 0,25 \text{ en el caso del perro (de Morais, 1992)}$$

El hallazgo de valores negativos sugiere la existencia de una acidosis dilucional mientras que valores positivos son compatibles con una alcalosis por concentración.

#### 2) Cambios en el Cl corregido:

$$\Delta Cl^{-} = (Cl^{-}_{medio\ normal} - Cl^{-}_{corregido})$$

Resultados positivos son compatibles con la existencia de alcalosis hipoclorémica, mientras que resultados negativos sugieren la existencia de acidosis hiperclorémica.



### 3) Variaciones en los aniones no medibles:

$$\Delta \text{ Aniones no medibles} = \text{EB} - (\Delta \text{ Agua libre} + \Delta \text{ Cl}^- + \Delta \text{ Albúmina} + \Delta \text{ Fósforo})$$

Valores negativos de este parámetro sugieren la presencia de acidosis orgánica.

#### Bloque II: $A_{\text{TOT}}$

Otra de las variables independientes que influye en el equilibrio ácido-básico es, como hemos visto,  $A_{\text{TOT}}$ , la cual se ve afectada principalmente por variaciones en la concentración de albúmina y de fósforo. A continuación exponemos las fórmulas de los principales factores que contribuyen al cambio de los ácidos débiles que vienen representados en la variable  $A_{\text{TOT}}$ .

$$\Delta \text{ Albúmina} = 3,7 (\text{Albúmina}_{\text{media normal}} (\text{g/dl}) - \text{Albúmina}_{\text{paciente}} (\text{g/dl})) = \text{mEq/L}$$

La obtención de resultados negativos de este cálculo sugiere la presencia de acidosis hiperproteinémica, mientras que los resultados positivos son compatibles con alcalosis hipoproteinémica.

$$\begin{aligned} \Delta \text{ Fósforo} &= 1,8 (\Delta \text{ Fósforo}_{\text{ajustado}} (\text{mmol/L})) = \text{mEq/L} \\ \Delta \text{ Fósforo}_{\text{ajustado}} &= (\text{Fósforo}_{\text{medio normal}} (\text{mg/dl}) - \text{Fósforo}_{\text{paciente}} (\text{mg/dl})) = \text{mg/dl} \\ 0,3229 (\text{Fósforo}_{\text{ajustado}} (\text{mg/dl})) &= \text{Fósforo}_{\text{ajustado}} (\text{mmol/L}) \end{aligned}$$

La existencia de valores negativos sugiere la existencia de acidosis hiperfosfatémica.

#### Bloque III: $p\text{CO}_2$

La última variable independiente es la  $p\text{CO}_2$ , que como en el caso del método tradicional nos aporta información acerca de perturbaciones respiratorias o a cerca de la compensación de un desequilibrio metabólico, de este modo, aumentos de la  $p\text{CO}_2$  son compatibles con la presencia de una acidosis de origen respiratorio, mientras que disminuciones de la misma indican alcalosis respiratoria (DiBartola, 2002).

PARÁMETRO	UNIDADES	VALOR
Sodio	mEq/L	148 (141-145)
Cloro	mEq/L	112 (105-120)
Fósforo	mg/dl	4,3 (2,1-6,5)
Albúmina	g/dl	3,6 (2,8-4,4)
SID	mEq/L	36

**Tabla 8:** Valores medios normales de los parámetros empleados en el análisis cuantitativo del equilibrio ácido-básico en perro (Russell *et al.*, 1996).

Finalmente, nos gustaría aclarar que este método algorítmico ha sido empleado con éxito en medicina veterinaria para entender la generación de los trastornos ácido-básicos complejos en animales pequeños y grandes (Whitehair *et al.*, 1995), pero también cuenta con detractores como Constable y Stämpfli (2005) que consideran que determina de forma imprecisa la concentración de iones fuertes no medibles cuando hay alteraciones de la variable  $A_{TOT}$ .

## 3.2. HOMEOSTASIS DEL CALCIO

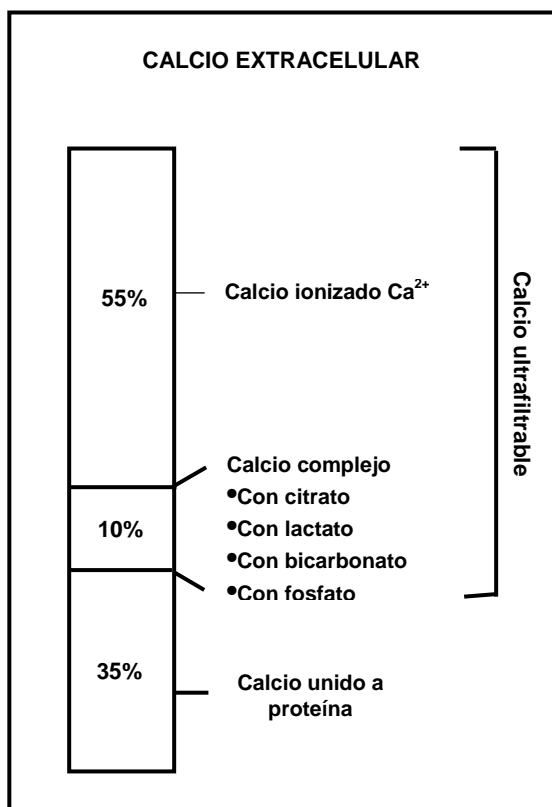
### 3.2.1. INTRODUCCIÓN: DISTRIBUCIÓN DEL CALCIO CORPORAL

El calcio es uno de los siete macroelementos minerales que forman parte de los seres vivos, siendo el catión más abundante en el cuerpo de los mamíferos (Payne, 1981). La mayor parte de este (99%) está localizada, junto con fosfato, en el esqueleto formando parte de los cristales de hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , los cuales además de proporcionar rigidez al esqueleto también actúan como reservorio (Barber, 2001). La mayor parte del calcio esquelético presenta poca capacidad para intercambiarse y menos del 1% se considera fácilmente disponible. La pequeña proporción de calcio óseo intercambiable con rapidez proviene de la fracción del líquido extracelular (LEC) del hueso presente entre osteoblastos y osteocitos y la matriz ósea. Casi todo el calcio “no esquelético” reside en el espacio extracelular y aunque sólo existen pequeñas cantidades en el intracelular, estas tienen una gran importancia biológica (Rosol *et al.*, 2002).

**Calcio intracelular:** El calcio intracelular total llega a exceder de 1mM, pero la fracción ionizada (calcio libre intracelular) supone menos del 0,1% del total. El calcio ionizado intracelular es un segundo mensajero importante en la respuesta a señales bioquímicas que

llegan a la célula a través de su membrana. La porción restante de calcio intracelular se encuentra secuestrado en organelos, unido a membranas o ligado a proteínas celulares. El secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias sirve para atenuar los aumentos de su concentración citosólica, mientras que el retículo endoplásmico actúa como un reservorio para incrementar la concentración citosólica de este mineral cuando es necesario. La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a proteínas del citoplasma o de membrana específicas constituye una forma de amortiguación intracelular del mismo, y si al mismo tiempo modifica la actividad de dichas proteínas actúa como sistema mensajero (Rosol *et al.*, 2002).

**Calcio extracelular:** La concentración de calcio extracelular se mantiene en su rango óptimo a través de procesos físico-químicos coordinados de forma conjunta con la acción de las hormonas calciotropas y controlado por los sensores de calcio (Schoenmakers *et al.*, 1999).



**Figura 1:** Distribución de las diferentes fracciones de calcio (Rosol *et al.*, 2002)

En el plasma y suero, el calcio se encuentra en tres formas: aproximadamente el 40% del calcio plasmático está unido de forma débil a proteínas (principalmente albúmina) y otro 10% ligado fuertemente a otros iones formando complejos. El 50% del calcio plasmático restante circula en forma de calcio ionizado ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y esta fracción resulta vital para el desarrollo de los procesos biológicos (Schoenmakers *et al.*, 1999).

Como expondremos a continuación, la unión del calcio a proteínas funciona como sistema tampón en el LEC, además de esta función, a día de hoy, no se ha descrito ninguna otra actividad biológica para esta unión (Rosol *et al.*, 2002).

La proporción de calcio presente en forma ionizada y en la fracción unida a las proteínas del plasma está condicionada por

el valor del pH plasmático; un medio ácido favorece la separación del calcio de las proteínas y da lugar a un incremento de la concentración de iones de calcio libres (Segura *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2004a), mientras que la alcalosis disminuye el calcio ionizado aumentando la fracción de calcio unida a proteínas. Por este motivo, la valoración del estatus ácido-básico es de mucha utilidad a la hora de evaluar las anormalidades del calcio sérico (Chew y Meuten, 1982).

La concentración de calcio varía poco entre individuos sanos, normalmente oscila entre 9,4 y 11,2 mg/dl en perros adultos y puede ser ligeramente superior en animales jóvenes (Dhupa y Proulx, 1998). Nelson y Couto en el año 2000 dan un rango más amplio considerando dentro de la normalidad concentraciones de calcio entre 9 y 12 mg/dl.

### 3.2.2. PRINCIPALES FUNCIONES DEL CALCIO

El calcio desempeña múltiples funciones en el organismo, a continuación resumimos las más importantes:

- Presenta una función estructural, puesto que junto con el fósforo, es uno de los componentes más abundantes del hueso y dientes. En los huesos aparece formando parte de los cristales de hidroxapatita y en los dientes principalmente como fluoruro cálcico (Guyton y Hall, 2006c).
- Participa en la contracción muscular. El calcio liberado desde el retículo sarcoplasmático induce la formación de puentes cruzados entre la actina y miosina, lo que se traduce en el acortamiento de la fibra muscular (Greco y Stabenfeldt, 1999).
- Es necesario para la liberación de hormonas por exocitosis y para la activación de diversas enzimas (Greco y Stabenfeldt, 1999).
- Este ión es preciso para que se lleve a cabo una correcta excitabilidad neuromuscular y transmisión del impulso nervioso. Al disminuir la concentración de calcio se describe un aumento de la excitabilidad de las fibras pre y postganglionares, apareciendo un efecto contrario cuando aumentan sus niveles (Castillo, 1993).
- Es un elemento esencial en la coagulación sanguínea al permitir la transformación de protrombina en trombina (Prieto, 1992).
- Este mineral parece ser imprescindible para la activación de los linfocitos T (Silva y Ruíz Moreno, 1998). Un descenso de los niveles de calcio extracelular puede

disminuir hasta un 40% la capacidad fagocítica de los macrófagos; además, la diapédesis y la fagocitosis de los neutrófilos también son dependientes de la concentración de este mineral (Young *et al.*, 1984; Tyzard, 1995).

- Está considerado como el principal mensajero iónico encargado de transmitir la información recibida en la superficie celular y enviarla al interior de la célula (Hurwitz, 1996).
- Otras funciones del calcio son el mantenimiento del tono de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos, control del metabolismo de glucógeno en el hígado y regulación del crecimiento y división celular (Rosol *et al.*, 2002).
- Por último, destacar el papel importantísimo del calcio en la dinámica del corazón, en la fertilización del óvulo, en la liberación de ácidos grasos precursores de las distintas prostaglandinas y leucotrienos y en la división celular (Segura *et al.*, 2000).

### 3.2.3. HOMEOSTASIS CÁLCICA

En condiciones normales los cationes divalentes, como es el caso del calcio, se absorben mal desde el intestino. Sin embargo, como expondremos posteriormente, la vitamina D facilita la absorción y hace que, por lo general, se absorba en torno a un 35% del calcio ingerido, siendo el restante eliminado a través de las heces (Guyton y Hall, 2006c).

En cuanto a la excreción renal de este mineral, debemos recordar que cerca del 90% del calcio del filtrado glomerular se reabsorbe en los túbulos proximales, las asas de Henle y la porción inicial de los túbulos distales. En tramos posteriores, como son las zonas finales de los túbulos distales y en las iniciales de los túbulos colectores, la reabsorción del 10% restante es muy selectiva y depende de los niveles del ión calcio en la sangre (Guyton y Hall, 2006c).

La concentración plasmática de calcio es controlada de forma rigurosa por mecanismos homeostáticos complejos que implican flujos de calcio entre el líquido extracelular, riñón, hueso e intestino. Estos flujos están controlados principalmente por tres hormonas: hormona paratiroidea (PTH), calcitonina y 1,25-dihidroxivitamina D. El calcio extracelular ha de mantenerse dentro de un rango estrecho, puesto que de ello dependen funciones celulares de gran importancia como las que hemos citado en el apartado anterior (Mundy y Guise, 1999).

### 3.2.3.1. HORMONA PARATIROIDEA (PTH)

#### 3.2.3.1.1. ESTRUCTURA, SÍNTESIS Y SECRECIÓN

La PTH es un péptido de cadena sencilla de 84 aminoácidos que es sintetizado y secretado por las células principales de la glándula paratiroidea. Inicialmente, estas células sintetizan pre-pro-PTH, un precursor de PTH con 115 aminoácidos. La pre-pro-PTH experimenta escisiones intracelulares para convertirse en PTH madura, con 84 aminoácidos. La cantidad de PTH disponible para su secreción depende del equilibrio entre síntesis y degradación dentro de las células principales. Estos procesos son regulados por el calcitriol y por las concentraciones de calcio intracelular (Rosol *et al.*, 2002).

Actualmente se conoce la secuencia de aminoácidos de la PTH en el perro, vaca, cerdo, rata, pollo y en el ser humano. Los estudios de inmunorreactividad hacen pensar que la mayor parte de los mamíferos pueden tener porciones amino-terminales muy similares de esta molécula (Orloff y Stewart, 1995).

El extremo amino es imprescindible para la unión de la molécula a receptores en la membrana celular, mientras la función del extremo carboxilo es actuar como guía de la PTH a través de la vía secretora celular. Aunque aún es tema de controversia, es probable que el extremo carboxilo no tenga un cometido significativo en el metabolismo del calcio después de la secreción de PTH por la glándula paratiroides (Orloff y Stewart, 1995).

La secreción de PTH tiene lugar mediante exocitosis de los gránulos secretores. En caso de gran demanda de la hormona, esta es secretada de manera directa desde la célula principal sin ser almacenada en dichos gránulos (Rosol *et al.*, 2002).

López *et al.* (2005) han descrito el patrón de secreción diurna de la PTH en perros y han encontrado que las concentraciones de esta hormona presentan pequeñas fluctuaciones durante el día, alcanzando valores máximos en torno a las 7 de la mañana, momento en el que sus niveles son aproximadamente el doble que los registrados durante el resto del día. Los autores atribuyeron las concentraciones más bajas de PTH que se observaron durante el día de estudio al efecto de la absorción del calcio de las comidas. Estos resultados coinciden con los descritos en la mayoría de estudios en humana (Markowitz *et al.*, 1988; Fuleihan *et al.*, 1997).

## FACTORES QUE REGULAN LA SECRECIÓN DE PTH

La secreción de PTH depende en gran medida de la concentración de calcio ionizado a través de un simple circuito de retroalimentación negativo. Las concentraciones séricas de PTH disminuyen cuando aumenta la calcemia, aunque la secreción completa de PTH no se llega a suprimir nunca por completo (Mundy y Guise, 1999).

La secreción de PTH en función a descensos de la calcemia se logra gracias a la presencia de un receptor en la membrana de las células principales con capacidad de regular las concentraciones intracelulares de calcio en función a las extracelulares; de modo que la disminución de los niveles extracelulares de este catión conlleva el descenso de su concentración en el interior celular siendo, finalmente, este estímulo el que desencadena la liberación de PTH (Rosol *et al.*, 2002). La síntesis de esta hormona es probablemente máxima bajo condiciones fisiológicas normales, puesto que las células paratiroides bajo condiciones de hipercalcemia muestran una disminución del ARNm de la PTH, mientras que en condiciones de hipocalcemia no se observa un incremento (Mundy y Guise, 1999).

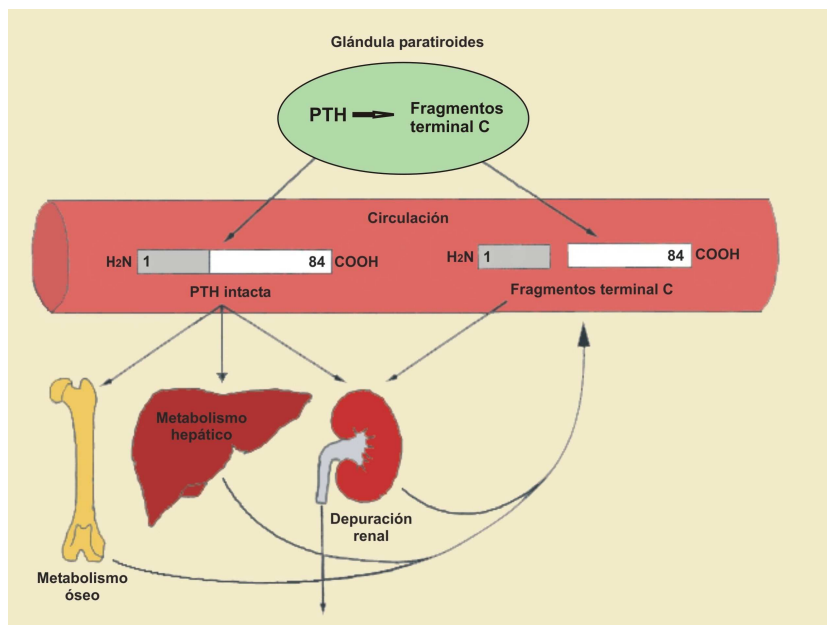
El calcitriol también tiene una función importante en la regulación de la síntesis y secreción de PTH. Inhibe la síntesis de PTH y estimula la del receptor de calcio en la membrana celular. Ambas acciones explican la necesidad de que existan concentraciones sanguíneas adecuadas de calcitriol para mantener la capacidad de la glándula paratiroides para reaccionar a cambios de las concentraciones extracelulares de calcio (Rosol *et al.*, 2002).

Las concentraciones séricas de fósforo regulan la secreción de PTH, principalmente de forma indirecta, secundaria a la disminución de la síntesis de calcitriol. La caída de la concentración plasmática de esta hormona trae consigo la disminución de la calcemia siendo la consecuencia final el aumento de la secreción de PTH (Rosol *et al.*, 2002). Además, estudios más recientes han detectado también un efecto directo de la fosfatemia en la secreción de PTH en perros (Estepa *et al.*, 1999a).

En condiciones normales, la concentración sérica de magnesio tiene escaso efecto en el control de la secreción de PTH, pero esta puede ser inhibida por valores muy elevados de este mineral (Rosol y Capen, 1997). Paradójicamente, la hipomagnesemia también provoca incapacidad de secretar PTH y, aunque el mecanismo celular que media este hecho continúa siendo incierto, se cree que es debido en parte a la menor sensibilidad de los receptores de membrana celular al  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de bajas concentraciones séricas de magnesio (Miki *et al.*, 1997).

### 3.2.3.1.2. METABOLISMO DE LA PTH

El metabolismo de la PTH es complejo y da lugar a varios fragmentos con actividad biológica variable. El péptido intacto (84 aminoácidos) y biológicamente activo presenta una vida media en la circulación menor a 4 minutos, siendo eliminado por macrófagos fijos (principalmente células de Kupffer en el hígado). El riñón y el hueso también participan en la degradación de la PTH intacta por un proceso de endocitosis mediada por receptor, pero es probable que este mecanismo sólo sea importante en condiciones asociadas a concentraciones séricas elevadas de hormona paratiroidea. Los macrófagos escinden la molécula entre los aminoácidos 33 y 43, de lo que resulta la liberación de una variedad de fragmentos carboxilo-terminal, mientras que la porción amino-terminal es totalmente degradada en el interior de los fagocitos. Tanto la PTH intacta como sus fragmentos son filtrados por los glomérulos y excretadas por el riñón (Rosol *et al.*, 2002). Los fragmentos carboxi-terminal (liberados por la glándula paratiroides y las células de Kupffer) tienen una vida media considerablemente mayor a la de la hormona intacta, principalmente porque son eliminados de forma exclusiva a través de la filtración glomerular (Mundy y Guise, 1999), estos fragmentos no muestran actividad importante en el metabolismo del calcio (Rosol *et al.*, 2002).



**Figura 2:** Degradación y depuración de la PTH. (Dibujo extraído de Rosol *et al.* 2002 y adaptado para esta memoria de tesis doctoral).



### 3.2.3.1.3. ACCIONES FISIOLÓGICAS DE LA PTH

Las acciones biológicas de la PTH se desarrollan en los siguientes órganos:

**En el hueso:** en él estimula la resorción osteoclástica y como consecuencia la liberación de calcio y fósforo a partir de éste (Mundy y Guise, 1999). El aumento de la calcemia resulta de la interacción de la PTH con receptores situados sobre los osteoblastos, que a su vez liberan mediadores que actúan sobre los osteoclastos, que son los encargados celulares finales de llevar a cabo la resorción ósea (Rosol *et al.*, 2002).

El hueso responde a la liberación de PTH en dos fases:

- Fase rápida: depende de la presencia continua de la PTH que provoca un gran flujo de calcio desde las zonas profundas del hueso, a partir del líquido óseo, hasta la superficie ósea a través de la activación de la bomba osteocito-osteoblasto (Rosol *et al.*, 2002; Guyton *et al.*, 2006c).
- Fase lenta: durante la cual se producen efectos de mayor magnitud y que no dependen de la presencia continua de la hormona (Rosol *et al.*, 2002). En esta fase tiene lugar la activación de los osteoclastos, esto es interesante a la luz de experimentos en los que no ha podido demostrarse la existencia de receptores para PTH en los osteoclastos, aunque sí en los osteoblastos (Rosol *et al.*, 2002). Estos últimos elaboran mediadores químicos indefinidos para estimular los osteoclastos de manera directa (McSheehy y Chambers, 1986). La activación de los osteoclastos tiene lugar en dos etapas: 1) activación inmediata de los osteoclastos ya formados y 2) formación de nuevos osteoclastos (Guyton *et al.*, 2006c).

A nivel óseo la hormona paratiroidea también puede actuar como agente anabólico en el hueso y estimular la formación osteoblástica de éste. Es todavía incierto el cometido fisiológico de la acción anabólica de la PTH *in vivo*, pero está descrito que la administración intermitente de PTH exógena incrementa la masa ósea en seres humanos y animales de experimentación (Rosol *et al.*, 2002).

Por último, destacar que la hormona paratiroidea presenta un efecto de resorción mucho más notorio sobre el hueso cortical que sobre el esponjoso, además se piensa que pueda tener capacidad para estimular la formación de este último (Sarko, 2005).

**En el riñón:** interviene en la estimulación de la reabsorción de calcio e inhibición de la reabsorción de fosfato de los túbulos renales (Mundy y Guise, 1999). La capacidad de la PTH

para fomentar la reabsorción renal de calcio se debe a la combinación de una acción directa sobre el túbulo contorneado distal y de una acción indirecta sobre la rama ascendente gruesa del asa de Henle, lugar donde actúa incrementando la carga positiva neta en la luz de la nefrona (Rosol *et al.*, 2002). Además eleva el ritmo de reabsorción de iones magnesio al tiempo que reduce la resorción de iones sodio, potasio y aminoácidos (Guyton *et al.*, 2006c). Finalmente es importante destacar que, a este nivel, también actúa estimulando la producción de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (regula la conversión de 25-hidroxicoлекаliferol a calcitriol y otros metabolitos de la vitamina D) (Mundy y Guise, 1999).

**A nivel gastrointestinal:** la PTH eleva la absorción intestinal de calcio y fosfato de forma secundaria al aumento de la producción renal de calcitriol (Mundy y Guise, 1999).

Las acciones biológicas que acabamos de describir transcurren tras la unión del extremo amino-terminal de la molécula de PTH con su receptor (Mundy y Guise, 1999). El receptor de PTH pertenece a una gran familia de receptores que contienen siete dominios de transmembrana y actúan a través de la activación de proteínas G (Juppner *et al.*, 1991). Este receptor se expresa en células del epitelio renal, osteoblastos y algunas otras células (Rosol *et al.*, 2002).

### 3.2.3.2. CALCITONINA

#### 3.2.3.2.1. ESTRUCTURA, SÍNTESIS Y SECRECIÓN

La calcitonina (CT) es un péptido de 32 aminoácidos sintetizado y secretado por las células parafoliculares (células C) de la glándula tiroides (Mundy y Guise, 1999). Como en el caso de la síntesis de PTH, el proceso de transcripción desencadena la formación de una molécula precursora de gran tamaño, pre-pro-calcitonina (pre-pro-CT) de 141 aminoácidos, que da lugar a la pro-calcitonina (pro-CT) de 111 aminoácidos por escisión de un fragmento en la porción amino-terminal. Finalmente, la pro-CT es procesada a calcitonina (32 aminoácidos) y catacalcina (21 aminoácidos), el papel fisiológico de esta última todavía es desconocido (Rodríguez, 1995).

#### FACTORES QUE REGULAN LA SECRECIÓN DE CALCITONINA

El estímulo regulador más importante de la secreción de calcitonina es la concentración de calcio iónico, incrementos en su concentración producen elevaciones en la secreción de calcitonina y a la inversa (Mundy y Guise, 1999).

Las hormonas peptídicas gastrointestinales, la gastrina en particular, son potentes secretagogos de calcitonina. Estos péptidos, probablemente sean los responsables de aumento de la secreción de esta hormona después de las comidas (Mundy y Guise, 1999).

La síntesis de calcitonina es inhibida por el calcitriol y posiblemente por otros factores que aún no han sido identificados (Schenmakers *et al.*, 1999).

#### **3.2.3.2.2. METABOLISMO DE LA CALCITONINA**

La calcitonina es metabolizada en minutos en la circulación y es eliminada predominantemente a través del riñón (Mundy y Guise, 1999). La pérdida de un solo aminoácido de su molécula provoca una gran disminución de su actividad biológica (Rodríguez, 1995).

#### **3.2.3.2.3. ACCIONES FISIOLÓGICAS DE LA CALCITONINA**

La calcitonina presenta un papel hipocalcemiante en el metabolismo del calcio (Rodríguez, 1995). Una de sus funciones más importantes es limitar el grado de hipercalcemia posprandial. Este efecto, junto con el de la PTH, hace que se mantenga la concentración sérica de calcio dentro de un margen estrecho. La calcitonina es secretada como respuesta a la hipercalcemia y también a comidas ricas en calcio (Rosol *et al.*, 2002).

Cuando las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  son bajas, la secreción de calcitonina es inhibida con el fin de permitir un aumento de las mismas merced a la influencia de la PTH (Schoenmakers *et al.*, 1999).

**Efectos sobre el hueso:** la calcitonina inhibe directamente la resorción ósea osteoclástica, este mecanismo es rápido, ocurre a los pocos minutos de producirse incrementos en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  sérico. Esta inhibición va acompañada por la producción de AMPc así como por una elevación del calcio citosólico en los osteoclastos, lo que conduce a la contracción de la membrana celular de estas células. Estos efectos son transitorios y es probable que su papel sea escaso en la regulación de la homeostasis cálcica de forma crónica, aunque puede resultar de importancia en el control a corto plazo de las concentraciones de calcio. Existen observaciones clínicas en el hombre que apoyan la idea de que la calcitonina presenta un mínimo efecto crónico ya que ni los pacientes atiroideos (déficit en la producción de calcitonina), ni los que padecen cáncer de tiroides (exceso de producción de calcitonina) experimentan alteraciones en la homeostasis cálcica (Mundy y Guise, 1999).

En el hueso también contribuye a aumentar la deposición de calcio y en la reserva intercambiable de  $\text{Ca}^{2+}$  (Schoenmakers *et al.*, 1999).

Durante etapas de desarrollo es necesario que se acumule gran parte del calcio que ingresa en el organismo a través del intestino para soportar el crecimiento del esqueleto. En este sentido se sabe que la calcitonina posee valores altos en la circulación fetal y su secreción es más efectiva en animales jóvenes, para ir disminuyendo con el transcurso del tiempo. La calcitonina también aumenta en la gestación y en la lactación para proteger el esqueleto materno (Rodríguez, 1995; Schoenmakers *et al.*, 1999).

**Efectos gastrointestinales:** esta hormona reduce la absorción de calcio desde el tracto gastrointestinal mediante dos mecanismos indirectos, por un lado retrasa el vaciado gástrico y por otro disminuye la ingesta (Schoenmakers *et al.*, 1999).

**Efectos sobre el riñón:** la calcitonina aumenta la eliminación de calcio y fósforo a nivel renal, contribuyendo a estados de hipocalcemia y de hipofosfatemia. Así pues, la acción de la calcitonina en el riñón es contraria a la de la PTH en lo que respecta al calcio y sinérgica si hablamos del fósforo (Rodríguez, 1995).

El receptor de la CT fue clonado por primera vez por Lin *et al.* en 1991 y al igual que el de PTH presenta siete dominios de transmembrana. El receptor de calcitonina existe en varias isoformas y su expresión parece estar influenciada por las concentraciones de dicha hormona (Mundy y Guise, 1999).

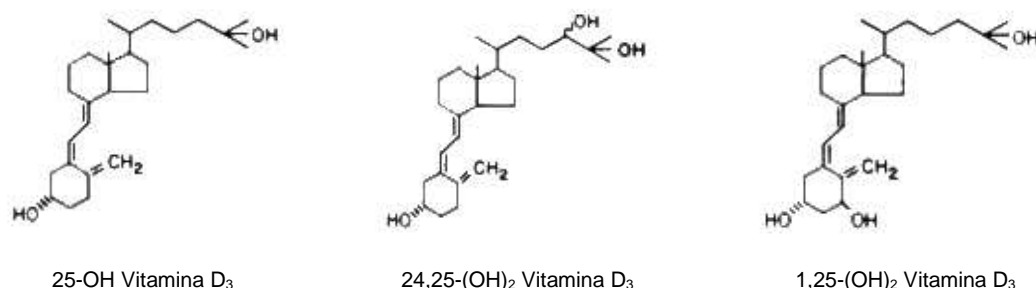
### 3.2.3.3. CALCIFEROLES (VITAMINA D)

#### 3.2.3.3.1. ESTRUCTURA, SÍNTESIS Y SECRECIÓN

La vitamina D es un seco-esteroide en el cual el anillo-B de la estructura ciclopentano-perhidrofenantreno está escindido (Rodríguez, 1995).

Las necesidades de vitamina D, en la mayoría de las especies domésticas, están cubiertas por consumo de vitamina  $\text{D}_2$  o  $\text{D}_3$  o por síntesis de vitamina  $\text{D}_3$  en la piel a partir del 7-dehidrocolesterol (Rodríguez, 1995). Esto ocurre por exposición de dicha molécula a los rayos ultravioleta B de 188 nm, de lo que resulta provitamina  $\text{D}_3$ , la cual a su vez experimenta conversión térmica a vitamina  $\text{D}_3$ . Los perros y gatos fotosintetizan de manera ineficaz la vitamina D en la piel, por lo que deben ingerirla en los alimentos. La vitamina D ingerida es absorbida sin alteraciones en el intestino (Rosol *et al.*, 2002; Hazewinkel y Tryfonidou, 2002).

Tanto el alimento natural como el alimento comercialmente disponible para perros y gatos contienen suficiente vitamina D para satisfacer sus requerimientos en estos animales. Por lo tanto, en perros y gatos domésticos las deficiencias de dicha molécula (raquitismo) son apreciadas sólo bajo circunstancias extremas, como en el caso de consumo de raciones estrictamente vegetarianas, atresia biliar o alteraciones congénitas del metabolismo de dicha vitamina (Hazewinkel y Tryfonidou, 2002).



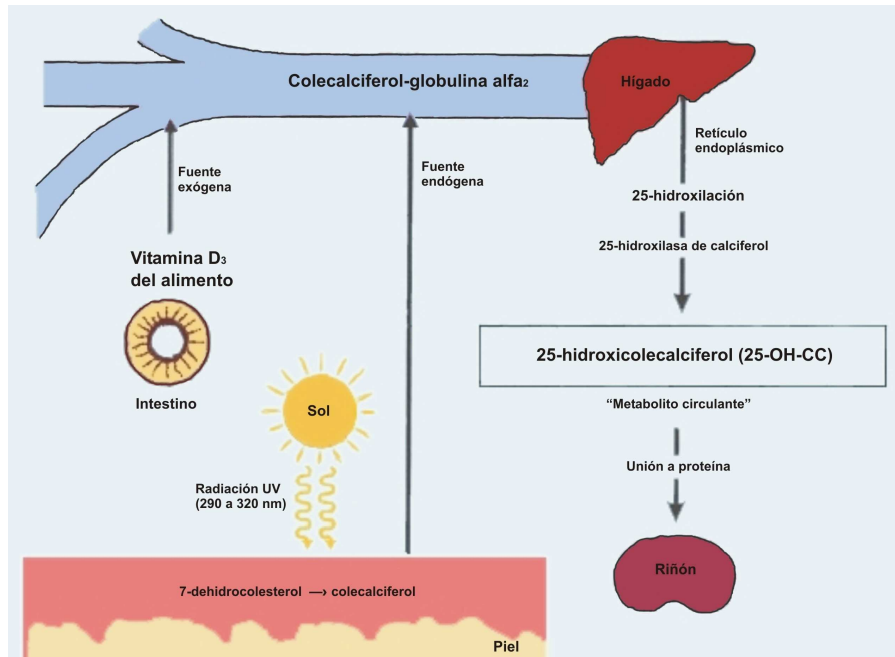
**Figura 3:** Principales metabolitos de la vitamina D (Tsang y Marder, 1986)

Los tres metabolitos más importantes del colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub> precursora de origen animal) son la 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (calcidiol), 1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> (calcitriol) y 24,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub>, siendo la hormona esteroide 1,25-dihidroxivitamina D el metabolito de mayor actividad biológica. En los mamíferos domésticos, los mismos tres metabolitos derivados de la vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol de origen vegetal) son igualmente bioactivos, de manera que se supone un uso genérico de los términos 1,25-dihidroxivitamina D y calcitriol para incluir los metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> y de la D<sub>2</sub> de origen animal y vegetal respectivamente (Mundy y Guise, 1999; Rosol *et al.*, 2002).

El colecalciferol y el ergocalciferol son transportados al hígado ligados a una proteína de unión, donde se produce su hidroxilación en posición 25 (Hart, 2004). La 25-hidroxivitamina D es la principal forma circulante de la vitamina D y actúa como reserva para la activación ulterior por 1 $\alpha$ -hidroxilación o catabolismo mediante 24-hidroxilación (Rosol *et al.*, 2002), esta última forma presenta una menor actividad biológica (Hart, 2004; Hart, 2005).

La proteína de unión a la vitamina D (VDBP) es una globulina  $\alpha_2$  (transcalciferina) que transporta vitamina D al hígado y otros órganos diana (Rosol *et al.*, 2002). El transporte de la 25-hidroxivitamina D depende de la capacidad de la VDBP para unirse a la hormona y de la disponibilidad de hormona libre. La afinidad por la unión a la VDBP condiciona la vida media

de los metabolitos de la vitamina D, así a mayor afinidad de unión mayor vida media (Hart, 2005).



**Figura 4:** Metabolismo de la vitamina D. El paso inicial de la activación de la vitamina D<sub>3</sub> de fuentes endógenas (fotoactivación) y alimentarias ocurre en el hígado con la formación de 25-hidroxicolecalciferol (25-hidroxitamina D<sub>3</sub>). (Dibujo extraído de Rosol *et al.* (2002) y adaptado para esta memoria de tesis doctoral)

La 25-hidroxitamina D es transportada hasta el riñón donde puede ser hidroxilada en dos posiciones (Rodríguez, 1995):

- En el C<sub>1</sub> por la enzima 1 $\alpha$ -hidroxilasa originando la 1,25-dihidroxitamina D.
- En el C<sub>24</sub>, para dar lugar a la 24,25-dihidroxitamina D mediante la actuación de la 24-hidroxilasa.

Esta última hidroxilación es considerada como el primer paso del catabolismo para la desactivación de la vitamina D (Rosol *et al.*, 2002). Las dos enzimas hidroxilasas implicadas en estos procesos están localizadas en las mitocondrias del túbulo contorneado proximal. La hidroxilación en posición 1 ó 24 depende de estímulos principalmente PTH dependientes. Dependiendo del lugar donde tenga lugar la hidroxilación la actividad biológica del metabolito formado será muy diferente, de hecho se considera que la actividad biológica es de 1:10:100

respectivamente, para la 25-hidroxivitamina D, 24,25-dihidroxivitamina D y 1,25-dihidroxivitamina D (Rodríguez, 1995).

#### **FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA REGULACIÓN DE LAS HIDROXILASAS**

Las concentraciones séricas de PTH, calcitriol, fósforo y calcio son los principales reguladores de la síntesis renal de calcitriol (Rosol *et al.*, 1995).

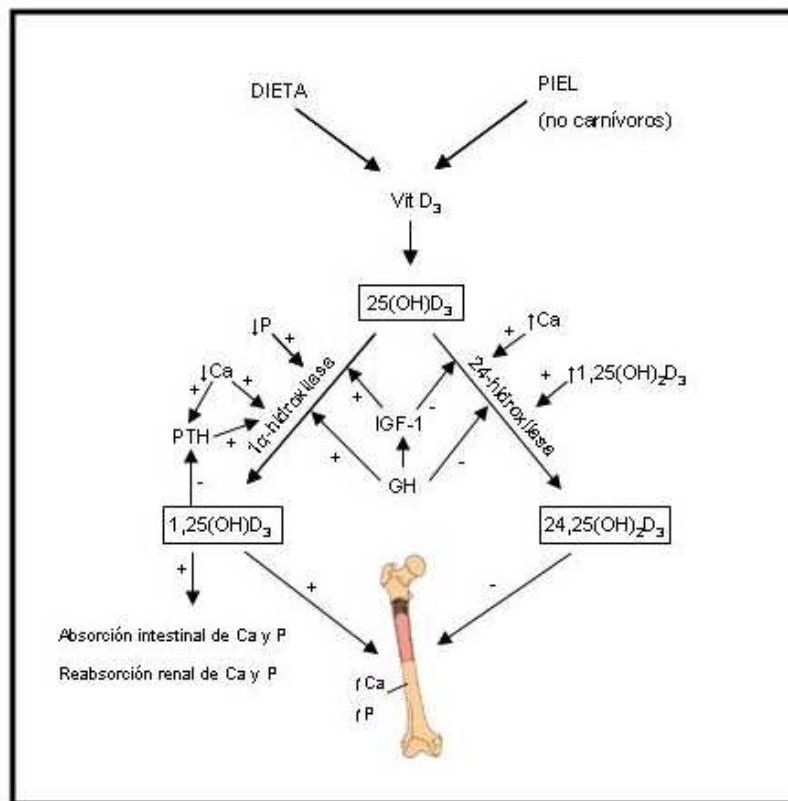
El eslabón entre calcemia y  $1\alpha$ -hidroxilasa es la PTH, es decir, cuando disminuye la calcemia se produce el aumento de PTH, desarrollándose un hiperparatiroidismo que trae consigo un incremento de la dicha enzima, este proceso provoca un aumento en la formación de 1,25-dihidroxivitamina D (Rodríguez, 1995; Hazewinkel y Tryfonidou, 2002). Por otro lado también se cree que la hipocalcemia puede llegar a estimular la  $1\alpha$ -hidroxilasa renal independientemente a la PTH (Rosol *et al.*, 2002). En el caso de que el balance de calcio llegue a ser negativo la  $1\alpha$ -hidroxilación se incrementa a expensas de la 24-hidroxilación (Hazewinkel y Tryfonidou, 2002).

Actualmente no se conoce exactamente cual es el efecto que presenta la hipofosfatemia sobre la  $1\alpha$ -hidroxilación, según Rodríguez (1995) la disminución de fosfato parece que estimula la actividad de la  $1\alpha$ -hidroxilasa sobre la 25-hidroxivitamina D por vías independientes de la PTH. Por el contrario Hazewinkel y Tryfonidou (2002) afirman que una adecuada secreción de PTH es un factor importante para la estimulación de la actividad de la  $1\alpha$ -hidroxilasa bajo condiciones de hipofosfatemia. Parece claro que en situaciones de hipofosfatemia aumentan los niveles de 1,25-dihidroxivitamina D, elevándose de forma secundaria la absorción intestinal de calcio y fosfato, pero en estudios realizados en perros a los que se les proporcionaba una gran cantidad de calcio en la dieta, el hipoparatiroidismo secundario originado por esta situación no permitió el aumento de la 1,25-dihidroxivitamina D (Hazewinkel y Tryfonidou, 2002). De todos modos, el incremento en la concentración 1,25-dihidroxivitamina D originado por cambios en la fosfatemia son menores que los que acontecen como respuesta a oscilaciones en la PTH (Rodríguez, 1995).

La propia 1,25-dihidroxivitamina D también parece regular en cierta medida la actividad de la  $1\alpha$ -hidroxilasa, de forma que niveles elevados de este metabolito la inhiben, bloqueando también la síntesis hepática del 25-hidroxicolecalciferol (Rodríguez, 1995).

Varios fármacos y hormonas poseen efectos sobre el metabolismo de la vitamina D, así por ejemplo los estrógenos y la testosterona incrementan la síntesis de calcitriol a nivel renal; la calcitonina estimula de manera directa la  $1\alpha$ -hidroxilación independientemente de la PTH e

incluso el bajo consumo de calcio en la ración a veces llega a ocasionar estimulación de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa renal en ausencia de hipocalcemia perceptible (Rosol *et al.*, 2002).



**Figura 5:** Diagrama general en el que se describen la influencia de minerales y hormonas sobre el metabolismo de la vitamina D<sub>3</sub> con sus efectos sobre los principales órganos diana. (Figura extraída de Hazewinkel y Tryfonidou (2002) y adaptada para esta memoria de tesis doctoral).

La raza puede influir en las concentraciones de los diferentes metabolitos de la vitamina D. En este sentido se ha descrito que perros de razas pequeñas presentan una concentración diez veces mayor de 24,25-dihidroxitamina D respecto a perros de razas grandes. Este hecho puede estar relacionado con las altas concentraciones de factores de crecimiento (GH e IGF-1) que aparece en razas grandes y que fue caracterizado por Nap *et al.* en 1992 como gigantismo transitorio juvenil. Recientemente se ha evidenciado que concentraciones plasmáticas elevadas de GH e IGF-1 tienen capacidad para suprimir la 24-hidroxilación (Hazewinkel y Tryfonidou, 2002).

Por último, destacar los efectos de la administración crónica de vitamina D<sub>3</sub> sobre la absorción intestinal de calcio. En el año 2002 Tryfonidou *et al.* concluyeron que la



disminución en la absorción intestinal de calcio que acontece en perros Gran Danés en crecimiento cuando se les administra vitamina D<sub>3</sub> de forma crónica es debida principalmente a un incremento en la 24,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>. De tal modo que este metabolito podría presentar un efecto negativo en la absorción intestinal de calcio en los perros en crecimiento, pudiendo estar mediado este efecto por su propio receptor o a través de un efecto alostérico sobre el RVD.

### **3.2.3.3.2. METABOLISMO DE LA VITAMINA D**

La excreción de vitamina D se lleva a cabo principalmente a través de la circulación enterohepática y su vida media es de aproximadamente 5 días (Rodríguez, 1995).

El hecho de que esta vitamina sea soluble en lípidos y su eliminación sea un proceso lento hace que en caso de ingestión excesiva no pueda ser excretada rápidamente por los riñones como sucede en el caso de las vitaminas hidrosolubles, pudiendo afectar de forma adversa a numerosos tejidos (Rodríguez, 1995).

### **3.2.3.3.3. ACCIONES FISIOLÓGICAS Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LA VITAMINA D**

El receptor 1,25-dihidroxitamina D (RVD) consiste predominantemente una proteína nuclear específica. El calcitriol presenta una gran afinidad por su receptor, debido en parte a que tiene tres grupos hidroxilos reactivos en comparación con el hidroxilo único del colecalciferol y los dos de la 25-hidroxitamina D (Rodríguez, 1995; Rosol *et al.*, 2002).

El calcitriol inicialmente se disocia de su proteína sérica de unión, a continuación difunde a través de las membranas celular y nuclear y, en el núcleo, se une con su receptor. El complejo calcitriol-receptor interactúa de manera heterodimérica con el receptor de retinoide X (RRX) y entonces se enlaza con el ADN nuclear para regular la transcripción de un gran número de genes dependientes de vitamina D que codifican, por ejemplo, proteínas transportadoras de calcio y proteínas de la matriz ósea (Rosol *et al.*, 2002; Hart, 2004). En unos pocos casos, como es el de la glándula paratiroidea, el calcitriol funciona como represor genético más que como activador génico y no ocurre heterodimerización con RRX (Rosol *et al.*, 2002).

El efecto neto de la acción RVD sobre sus tejidos diana habituales (intestino, riñón y hueso) es elevar los niveles de calcio en sangre (Rodríguez, 1995).

**A nivel intestinal:** el calcitriol fomenta el transporte de calcio y fosfato desde la luz intestinal hacia el plasma a través del enterocito. Se requiere de energía en forma de ATP para transportar el calcio desde los enterocitos hacia la sangre y para absorber fosfato desde la luz intestinal. El calcitriol induce la síntesis de la bomba de calcio en la membrana plasmática y de la proteína de cotransporte de sodio y fosfato que vehicula fósforo hacia el interior del enterocito (Rosol *et al.*, 2002).

Además, el calcitriol incrementa la permeabilidad del borde en cepillo al calcio e induce la síntesis de la proteína de unión al calcio (CaBP). Esta proteína sirve como un amortiguador que protege a los enterocitos de las concentraciones tóxicas de iones calcio al tiempo que transporta calcio a través de la célula (Rosol *et al.*, 2002).

**A nivel óseo:** la 1,25-dihidroxivitamina D presenta diversas acciones que resumimos a continuación:

- Regula el movimiento de calcio y de fósforo en el hueso. Aunque en un principio se pensaba que este efecto estaba influenciado por la PTH, hoy es sabido que dosis fisiológicas de 1,25-dihidroxivitamina D estimulan la actividad osteoclástica en ausencia de PTH (Rodríguez, 1995). Los receptores de la vitamina D en el hueso están presentes en los osteoblastos y posiblemente estas células secreten factores como respuesta al calcitriol con capacidad de activar a los osteoclastos (Rosol *et al.*, 2002). En el incremento de la resorción del hueso, la 1,25-dihidroxivitamina D y la PTH se potencian mutuamente (Rodríguez, 1995).
- Estimula la diferenciación de los osteoclastos y osteoblastos a partir de sus células precursoras (Schoenmakers *et al.*, 1999).
- Interviene en correcta mineralización ósea gracias a la existencia de receptores de esta hormona en los osteoblastos que median la producción de múltiples proteínas óseas como la fosfatasa alcalina, el colágeno tipo I, la osteocalcina y la osteopontina (Rodríguez, 1995; Rosol *et al.*, 2002). Esta hormona presenta, además, efectos estimulantes sobre la placa de crecimiento, aumentando la proliferación de condrocitos, la producción de matriz y la mineralización del cartílago (Schoenmakers, 1999). Además la contribución del calcitriol a nivel de la absorción intestinal de calcio y fosfato facilita el aporte de los minerales necesarios para que se lleve a cabo una correcta mineralización (Rodríguez, 1995).

- El calcitriol provoca un incremento en la liberación de IGF-1, que es transformado posteriormente a nivel de los osteoblastos y de los condrocitos en el factor de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ); este factor contribuye al aumento de la formación ósea (Schoenmakers *et al.*, 1999).

En el proceso de remodelación ósea, la 24,25-dihidroxitamina D también presenta acciones importantes, de modo que contribuye a la fase de maduración del osteoide previa a la mineralización. Este metabolito cuenta con efecto estimulador en diferentes zonas de la placa de crecimiento. *In vitro*, inhibe la proliferación de condrocitos, pero estimula su diferenciación y la síntesis de colágeno y de proteínas no colágenas. *In vivo*, la ausencia de 24,25-dihidroxitamina D durante el proceso de osificación intermembranosa provoca una acumulación de osteoide no osificado, lo que sugiere que su papel en la regulación de este proceso es más importante que en el proceso de crecimiento fiseal y de osificación endocondral (Schoenmakers *et al.*, 1999).

**A nivel renal:** el calcitriol promueve la reabsorción de calcio al inducir la síntesis de la proteína CaBP en las células tubulares renales, lo que activa la bomba de calcio en la membrana plasmática de las mismas (Rosol *et al.*, 2002); además incrementa la respuesta del túbulo a la PTH (Rodríguez, 1995). Por otro lado facilita la reabsorción de fósforo desde el filtrado glomerular (Rosol *et al.*, 2002).

Finalmente, destacar que la 1,25-dihidroxitamina D inhibe la actividad de la  $1\alpha$ -hidroxilasa y estimula a la 24-hidroxilasa, con la consiguiente formación de 24,25-dihidroxitamina D. Este mecanismo impide la producción excesiva de calcitriol (Rodríguez, 1995; Rosol *et al.*, 2002).

**Otros niveles:** se han hallado receptores para la 1,25-dihidroxitamina D en tejidos tan dispares como: hipófisis, timo, parótida, paratiroides, mama, páncreas, piel, testículo, útero, ovario y recientemente en queratinocitos, fibroblastos cutáneos y células epiteliales (Rodríguez, 1995; Rosol *et al.*, 2002).

Las células principales de la paratiroides poseen receptores nucleares para la 1,25-dihidroxitamina D, de forma que niveles elevados de esta inhiben la síntesis de PTH (Rodríguez, 1995). El calcitriol puede considerarse el principal factor de control para la transcripción del gen que codifica la PTH y para la posterior síntesis de esta hormona, puesto que no es posible suprimir dicha síntesis en ausencia de calcitriol aunque exista hipercalcemia. La secreción de PTH disminuye de 12 a 24 horas después de la exposición a calcitriol, por el contrario la PTH estimula la síntesis renal de calcitriol (Rosol *et al.*, 2002).

La inhibición del calcitriol sobre la secreción de PTH también ocurre por vía indirecta, puesto que la 1,25-dihidroxitamina D eleva la calcemia al estimular la absorción intestinal de calcio (Rodríguez, 1995).

**Otras funciones:** las propiedades que describimos a continuación no están relacionadas con el control de la calcemia.

- Efectos antiproliferativos: estudios realizados en animales de experimentación han proporcionado evidencias de acciones anticancerígenas por parte de análogos de la 1,25-dihidroxitamina D en cánceres de colon, hepatocelulares, gastrointestinales y de la piel. Esta actividad preventiva obedece en parte a la capacidad de esta hormona de regular la diferenciación y la proliferación celular, de modo que las células tumorales que poseen RVD al ser expuestas al calcitriol disminuyen su actividad proliferativa (Lin y White, 2003; Hart, 2004).
- Efectos inmunomoduladores: el RVD está presente en la mayoría de las células del sistema inmunitario, incluyendo los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno como los macrófagos y las células dendríticas. Existen evidencias concluyentes de que la 1,25-dihidroxitamina D es un modulador de la función del sistema inmune, en consonancia con su capacidad para controlar la diferenciación celular (Lin y White, 2003). La 1,25-dihidroxitamina D es también capaz de inducir la diferenciación de monocitos a macrófagos (Hart, 2004).
- Efectos neuroprotectores: el RVD está ampliamente representado en el SNC, dicho receptor induce de manera notoria la expresión del *factor de crecimiento de nervios*. Determinados experimentos realizados *in vivo* han demostrado que la 1,25-dihidroxitamina D retrasa la disminución en la densidad neuronal relacionada con la edad en el hipocampo de ratas (Landfield y Cadwallader-Neal, 1998). Además, el calcitriol puede actuar directamente sobre cultivos de neuronas procedentes del hipocampo de ratas inhibiendo la expresión de marcadores asociados al envejecimiento neuronal (Brever *et al.*, 2001). Por último, decir que ciertos estudios mostraron que esta hormona presenta un poder protector frente a los efectos neurotóxicos de ciertos agentes (Shinpo *et al.*, 2000).

### 3.2.3.4. OTRAS HORMONAS DE INTERÉS

Existen toda una serie de hormonas que tienen un efecto directo o indirecto sobre el crecimiento óseo, pero no están tan estrictamente relacionadas con la regulación y la homeostasis del calcio y del fósforo. A continuación tratamos las más importantes.

#### 3.2.3.4.1. PÉPTIDO RELACIONADO CON PTH (PR-PTH)

Es un péptido de 141 aminoácidos que presenta homología con los 13 primeros aminoácidos de la PTH. Este péptido se une al receptor de la paratohormona y lo activa, siendo este el motivo por el que es capaz de mimetizar los efectos de dicha hormona en el hueso, el riñón y el intestino. Se sabe que este factor es expresado por muchos carcinomas y también ha sido descrito en linfomas de células T que cursan con hipercalcemia humoral (Mundy y Guise, 1999).

Además de en estados patológicos se ha demostrado su presencia en muchos tejidos normales, como células epiteliales de la piel, glándulas endocrinas, músculo liso, esquelético y cardíaco, glándula mamaria en lactación, placenta, glándulas paratiroides fetales, hueso, encéfalo y linfocitos. Además presenta numerosas acciones tanto en el feto como en el individuo adulto (Rosol *et al.*, 2002).

Este péptido estimula la resorción osteoclástica del hueso y promueve la reabsorción del calcio en los túbulos renales en concentraciones similares a las de la PTH (Mundy y Guise, 1999).

Aunque el Pr-PTH circula en la sangre a bajas concentraciones es producido por numerosos tejidos. Este péptido actúa principalmente como regulador celular paracrina y también es posible que participe en el transporte de calcio a la leche durante la lactación. El papel fisiológico del Pr-PTH permanece sin esclarecer totalmente, es probable que no presente efectos reguladores en la homeostasis cálcica bajo condiciones fisiológicas en adultos, sin embargo, durante la vida fetal actúa como hormona reguladora del calcio, siendo producido por la glándula paratiroides fetal y la placenta. Finalmente, destacar que en pacientes con hipercalcemia humoral por malignidad se comporta como una hormona reguladora del calcio sistémico anormal e imita las acciones de la PTH (Mundy y Guise, 1999; Rosol *et al.*, 2002).

Estudios llevados a cabo en ratones transgénicos han comprobado sus efectos locales sobre la diferenciación del cartílago concluyendo que el Pr-PTH es un inhibidor esencial de la

diferenciación celular del cartílago y su ausencia conduce a anormalidades en las placas de crecimiento (Weir *et al.*, 1996).

#### **3.2.3.4.2. HORMONAS SEXUALES: ESTRÓGENOS Y ANDRÓGENOS**

Las hormonas sexuales, además de los efectos sistémicos y sobre los órganos de la reproducción, producen efectos importantes sobre el hueso, siendo sus repercusiones variables dependiendo de la etapa de vida en la que se encuentre el animal.

En personas y animales jóvenes influyen sobre el momento en el que se produce la fusión de las epífisis. En el desarrollo sexual precoz la maduración esquelética se acelera y el crecimiento se detiene (Fawcett y Jensh, 1999). En 1991 Salmeri *et al.* en un trabajo realizado con cachorros a los que castraron a diferentes edades comprobaron que las hormonas sexuales contribuyen al cierre de las placas de crecimiento. Recientemente Talwar *et al.* (2006) concluyeron que los estrógenos disminuyen el espesor del cartílago por inhibición de la proliferación de los condrocitos e incremento de la maduración de los mismos.

Durante la lactación y la gestación, los estrógenos inhiben la resorción ósea evitando una excesiva desmineralización del esqueleto (Labadía, 1995; Guyton y Hall, 2006c).

En medicina humana han comprobado que la aparición de osteoporosis en hombre y mujeres de edad avanzada está asociada con desequilibrios en el recambio óseo, que incluyen aumento de la resorción ósea como consecuencia de un incremento de la formación y de la actividad de los osteoclastos. Estos cambios están relacionados con una disminución de estrógenos y testosterona en sujetos de edad avanzada, ya que estas hormonas cuentan con un efecto inhibitor sobre la resorción ósea mediado por diferentes mecanismos (Michael *et al.*, 2005). Así, en un ensayo realizado por Fukuda y Iida (2000) concluyeron que perros orquidectomizados a los dos años de edad sirven como modelo animal para el estudio de la osteoporosis causada por hipogonadismo en el hombre.

#### **3.2.3.4.3. GH/IGF-1**

El primer trabajo que examinó los efectos sistémicos de la GH sobre el esqueleto adulto fue realizado en 1969 por Harris y Heaney en perros, este estudio mostró la presencia de un efecto anabólico con aumento de la masa ósea. Después de esa primera aproximación, esta acción ha sido corroborada en trabajos posteriores, entre ellos, recientemente por Kotzmann *et al.* (2001) los cuales llevaron a cabo un estudio sobre pacientes desnutridos que estaban siendo sometidos a hemodiálisis, a los que administraron un tratamiento con GH

recombinante durante 3 meses y pudieron comprobar que se producía un incremento significativo del propéptido carboxiterminal de procolágeno tipo I, que es un marcador de formación ósea.

La GH aumenta la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos vía directa a través de la interacción con los receptores de GH y vía indirecta estimulando la producción de IGF-1 a nivel local (acción autocrina/paracrina) (Chenu *et al.*, 1990; Kassem *et al.*, 1993; Isaksson *et al.*, 2000). Gracias a su propio receptor, el IGF-1 estimula la proliferación de los preosteoblastos, aumenta la actividad de los osteoblastos maduros y la síntesis de matriz ósea en particular (Rosén *et al.*, 1994).

Aunque los mecanismos biológicos exactos de la acción de la GH sobre el hueso maduro no se conocen totalmente, está descrito que alteraciones de las concentraciones de GH circulante están asociadas a modificaciones de la densidad ósea en el adulto (Diamond *et al.*, 1989; Seeman *et al.*, 1982). Como ya hemos referido, los efectos de la GH sobre los osteoblastos se conocen bien, pero todavía no existen argumentos a favor de una acción directa de la GH o del IGF-1 sobre los osteoclastos (Chapurlat y Delmas, 1999).

También existen experiencias de que la acidosis metabólica hiperclorémica (sin modificaciones del *anion GAP*) cursa con retraso en el crecimiento; Challa *et al.* (1993) verificaron en ratas a las que provocaron este tipo de acidosis con la administración de cloruro amónico una inhibición significativa de la producción de GH respecto a los controles, lo que puede estar en clara relación con el retraso en el crecimiento que sufrían estos animales.

### **Interacciones de la GH y de las diferentes hormonas del tropismo óseo**

Los efectos anabólicos de la GH sobre el esqueleto parecen ser posibles gracias tanto a un efecto directo a través de sus receptores en los osteoblastos, como a la producción local de IGF-1, puesto que la síntesis de este péptido inducida por PTH no se produce en el hueso de ratas con deficiencia de GH (Hock y Fonseca, 1990; Chenu *et al.*, 1990; Kassem *et al.*, 1993; Isaksson, 2000).

La interacción de la GH y del IGF-1 con los estrógenos es más compleja. Los estrógenos provocan un aumento de la producción de IGF-1 en los cultivos celulares de osteoblastos, pero estos efectos todavía no se conocen totalmente (Ernst y Rodan, 1991). En el caso de las mujeres, la liberación fisiológica de estrógenos aumenta la secreción hipofisaria de GH

pero conduce a una resistencia relativa al efecto estimulador de la GH sobre la producción de IGF-1 (Kerrigan y Rogol, 1992; Juul *et al.*, 1994).

Los glucocorticoides, en administraciones de corta duración, estimulan la secreción hipofisaria de GH, mientras que su administración de forma continuada provoca una disminución importante de su síntesis (Giustina y Wehrenberg, 1992). Los glucocorticoides disminuyen también la producción y la actividad del IGF-1 (Rosén *et al.*, 1994; Popovic *et al.*, 1993).

La información concerniente a las interacciones entre la 1,25-dihidroxitamina D y el sistema GH/IGF-1 es muy limitada; se ha descrito un efecto estimulante de la vitamina D sobre la producción de IGF-1 en ciertos tejidos (Rosén *et al.*, 1994). Otros autores también han detectado el efecto inverso, por ejemplo, Tryfonidou *et al.* en el año 2003 realizaron un estudio en perros a los que administraron dosis de GH superiores a las fisiológicas entre las 12 y las 21 semanas de edad comparando este grupo con un grupo control. Estos investigadores obtuvieron un incremento de 2,5 a 3,5 veces en la concentración de IGF-1 y un aumento de los niveles de 1,25-dihidroxitamina D acompañado de un bloqueo en la producción de 24,25-dihidroxitamina D. A pesar de los diferentes efectos encontrados en el metabolismo de la vitamina D, sólo fueron observados efectos moderados en la absorción intestinal de calcio y fósforo. La GH mostró efectos anabólicos específicos en el metabolismo óseo que no se vieron acompañados de resorción ósea, lo que podría provocar alteraciones en la remodelación ósea y enostosis.

En resumen, la GH participa de manera compleja en la regulación de la modelación y de la remodelación ósea y sus efectos se producen en gran medida a través de su intermediario el IGF-1 (Chapurlat y Delmas, 1999).

#### **3.2.3.4.4. GLUCOCORTICOIDES**

Dentro del grupo de las hormonas que tienen un papel secundario en el metabolismo del calcio, los glucocorticoides son los que han recibido una mayor atención, esto es debido, sobre todo, a la gran importancia de su uso en el tratamiento de la inflamación tisular y de las reacciones inmunológicas, así como en enfermedades que afectan a un gran número de órganos (pulmón, articulaciones, piel, músculo, ojos y nervios), lo que hace que estas sustancias tengan un uso muy extendido tanto en medicina humana como en veterinaria (Ton *et al.*, 2005).



Los glucocorticoides ejercen varias acciones sobre el metabolismo óseo, tanto directas como indirectas, a continuación describimos las más importantes:

La administración prolongada de una excesiva cantidad de glucocorticoides (dosis farmacológicas) induce retraso en el crecimiento tanto en el caso de personas como de animales y la pérdida de hueso ocurre sobre todo a partir de los 6-12 meses de su administración de forma crónica, aunque ya existen estudios en los que se ha visto un descenso en la formación ósea a las pocas semanas de inicio de su administración (Bornefalk *et al.*, 1998; Lems *et al.* 1998). Esta pérdida es más marcada en el hueso trabecular, probablemente porque la formación y la resorción óseas normalmente son mayores en esta zona (Izawa *et al.*, 1985; Ton *et al.*, 2005).

A día de hoy existe un acuerdo general, basado en estudios histomorfométricos, en que la disminución de la formación ósea es la razón más importante de que los corticoides conduzcan a la pérdida de hueso (Lo Cascio *et al.*, 1995; Dalle Carbonare *et al.*, 2001). Los glucocorticoides deprimen la formación del hueso por inhibición de la osteoblastogénesis e incremento de la apoptosis de osteoblastos. Además, inducen la muerte *in situ* de segmentos aislados de hueso (osteonecrosis), esto ocurre, posiblemente, en relación con un aumento de la apoptosis de osteocitos, lo que sugiere que la pérdida de hueso puede deberse a una disminución numérica de las células óseas. Además, los glucocorticoides incrementan la expresión de los receptores Notch1 y Notch2 en los osteoblastos; se considera que estos receptores juegan un papel negativo en la diferenciación celular de los osteoblastos y pueden suprimir la síntesis de IGF-1 inhibiendo, por tanto, sus efectos estimuladores en la síntesis de proteínas del hueso. Finalmente, los glucocorticoides inducen modificaciones en las características funcionales de los osteoblastos, suprimiendo directamente su actividad y por lo tanto la síntesis de la matriz ósea (Lyles *et al.*, 1993; Popp *et al.*, 2006). Esta disminución que los tratamientos con glucocorticoides producen sobre la formación del hueso se ha comprobado en algunos estudios en los que se ha valorado las concentraciones de marcadores bioquímicos de formación ósea, de este modo, se ha visto que el propéptido carboxiterminal de colágeno tipo I presenta una caída de un 30% en pacientes asmáticos tratados con 60 mg al día de prednisona durante 1 semana (Bornefalk *et al.*, 1998). En otro estudio llevado a cabo por Lems *et al.* (1998) constataron que la administración de prednisona a 10 mg al día producía un descenso del PCPI de un 10% en 1-2 semanas. Por su parte Ton *et al.* (2005) pudieron comprobar una disminución del PCPI, PNPI y de la

osteocalcina al aplicar dosis bajas de prednisona durante seis semanas. En ninguno de estos estudios pudieron observarse variaciones de la fosfatasa alcalina de origen óseo.

Además de por estos mecanismos directos, la inhibición de la formación ósea asociada a tratamientos crónicos con glucocorticoides puede estar mediada asimismo por mecanismos indirectos, como cambios en el metabolismo de la vitamina D. En 1985, Izawa *et al.*, en un trabajo llevado a cabo en perros, encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas de 25-hidroxivitamina D y 1,25-dihidroxivitamina D durante el tratamiento a largo plazo con hidrocortisona. La disminución de la concentración de 1,25-dihidroxivitamina D puede contribuir al deterioro parcial de la absorción intestinal de calcio y causar la supresión de la formación ósea. Además, dichos autores constataron la presencia de hipercalciuria e hiperfosfaturia en estos animales, lo que puede conducir a un balance negativo del calcio y a un deterioro de la formación ósea.

Los glucocorticoides también presentan un efecto directo sobre el cartílago puesto que actúan inhibiendo la síntesis de colágeno y la biosíntesis de glucosaminoglicanos (Izawa *et al.*, 1985).

El tema de si los glucocorticoides presentan o no capacidad para inducir la aparición de resorción ósea es, todavía, muy controvertido, aunque contamos con estudios realizados en medicina humana donde han constatado que el empleo de estas hormonas en dosis superiores a las farmacológicas puede estimular también los mecanismos de resorción ósea (Canniggia *et al.*, 1981; Dempster, 1989; Lo Cascio *et al.*, 1998). En trabajos realizados empleando dosis bajas de glucocorticoides no se ha corroborado la presencia de este incremento en la resorción ósea, un ejemplo, lo tenemos en el estudio realizado por Ton *et al.* (2005) en el cual no constataron la presencia de un incremento de la resorción ósea mediada por células, con la determinación de marcadores bioquímicos, asociada a la administración de dosis bajas de prednisona durante seis semanas en mujeres posmenopáusicas.

Las teorías del mecanismo de acción por el cual dosis elevadas de glucocorticoides conducirían a un aumento de la resorción ósea mediada por células incluyen un incremento del factor RANKL y de otras citoquinas proresortivas, se cree que estos factores pueden provocar un aumento de la vida media de los osteoclastos y una disminución de su apoptosis (Popp *et al.*, 2006). A mayores, Kondo *et al.* (2007) han verificado que tratamientos con dexametasona disminuyen la síntesis de osteoprotegerina por parte de los osteoblastos, la disminución de dicha molécula ha sido relacionada con osteoporosis por abundancia de

osteoclastos (Bucay *et al.*, 1998). El aumento de la resorción ósea asociada al empleo de glucocorticoides también, aunque de forma más controvertida, se ha intentado explicar en base a la aparición de un hiperparatiroidismo secundario a la disminución de la absorción intestinal de calcio.

#### **3.2.3.4.5. TSH Y HORMONAS TIROIDEAS**

Las hormonas tiroideas son necesarias para el crecimiento normal del esqueleto y para su maduración, además participan en el mantenimiento de la masa ósea del adulto (Bassett y Williams, 2003; Nilsson *et al.*, 2005).

El hipotiroidismo en la infancia se caracteriza por detención del crecimiento, disgénesis de las epífisis, retraso en la edad del hueso y pequeña estatura; mientras que la tirotoxicosis provoca la aparición de crecimiento acelerado, edad avanzada del hueso y, en casos severos, cierre prematuro de las placas de crecimiento y de las suturas craneales (Bassett y Williams, 2003).

Aquellas personas con tirotoxicosis o cualquier otra causa desencadenante de una disminución de los niveles de TSH presentan mayor riesgo de padecer fracturas osteoporóticas. Recientemente, se ha propuesto que la TSH podría ser un regulador directo negativo del recambio óseo actuando a través de sus propios receptores tanto en osteoclastos como en osteoblastos. De este modo, la deficiencia de TSH puede ser parcialmente responsable de la pérdida esquelética observada en casos de tirotoxicosis (Galliford *et al.*, 2005).

#### **3.2.3.4.6. LEPTINA**

La leptina, proteína secretada principalmente por el tejido adiposo, regula la ingesta de comida y el peso corporal (Nilsson *et al.*, 2005). Se ha visto que la deficiencia de leptina en ratones deteriora el crecimiento longitudinal en los huesos, mientras que el tratamiento de estos animales con inyecciones de leptina lo aumenta (Steppan *et al.*, 2000). En estudios realizados *in vivo* es difícil distinguir entre el efecto directo de la leptina sobre el hueso y los efectos mediados por su influencia sobre el balance nutricional, sobre el eje GH/IGF-1 y sobre los niveles de corticoides circulantes (Nilsson *et al.*, 2005).

### 3.3. FÓSFORO

#### 3.3.1. INTRODUCCIÓN: DISTRIBUCIÓN DEL FÓSFORO CORPORAL

El fósforo está presente en el cuerpo en forma orgánica (fosfolípidos y ésteres de fosfato) e inorgánica. Cerca del 80 al 85% del fosfato corporal total se encuentra como hidroxapatita inorgánica en el hueso, en tanto que el 15% restante aparece en tejidos blandos como el músculo. La mayor parte del fósforo de los tejidos blandos es orgánico y puede convertirse con facilidad a la forma inorgánica según se requiera. El compartimento del líquido extracelular contiene menos del 1% de las reservas corporales totales de fósforo (Willard y DiBartola, 2002).

El fósforo inorgánico se encuentra en plasma bajo dos formas principales,  $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Cuando aumenta la cantidad total de fosfato en el LEC, lo hace también la cantidad de cada uno de estos dos iones. La proporción de estas dos formas se modifica en función del pH de la solución en la que se encuentren; en el momento en el que el pH se hace más ácido, se produce un aumento relativo del  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y un descenso del  $\text{HPO}_4^{2-}$ , mientras que ocurre lo contrario cuando la solución se vuelve alcalina, actuando como sistema tampón. Debido a que es difícil determinar químicamente las cantidades exactas de  $\text{HPO}_4^{2-}$  y de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  en sangre, habitualmente la cantidad total de fosfato se expresa en términos de miligramos de fósforo por decilitro de sangre (Guyton y Hall, 2006b).

Aunque el fósforo circula en formas orgánicas e inorgánicas, es típico que los laboratorios clínicos midan el fósforo inorgánico. Cerca del 10-20% del fosfato inorgánico en el suero está unido a proteínas y el resto circula como un anión libre o en formando complejos con el sodio, magnesio o calcio. Tanto las fracciones libres como los complejos de fósforo están disponibles para ultrafiltración por los glomérulos renales (Willard y DiBartola, 2002).

Las concentraciones séricas normales de fósforo en los perros adultos varían de 2,5 a 6 mg/dl, aunque por lo general pueden ser más altas en perros menores de un año de edad (Willard y DiBartola, 2002).

#### 3.3.2. PRINCIPALES FUNCIONES DEL FÓSFORO

El ión fosfato ( $\text{PO}_4^-$ ) es el principal anión intracelular y por este motivo presenta una importancia fundamental para todos los sistemas biológicos.

- El fosfato orgánico está presente en los productos intermediarios del metabolismo de la glucosa. Forma parte de la estructura de todos los compuestos transmisores de energía como el trifosfato de adenosina (ATP), de cofactores como el dinucleótido del ácido nicotínico y de lípidos como la fosfatidilcolina. Además actúa como modificador covalente de numerosas enzimas (Genuth, 2006).
- El fosfato inorgánico actúa como fuente de fosfato, lo cual es esencial para la estructura del hueso y del diente, así como para el correcto funcionamiento orgánico, de hecho, la depleción grave de fosfato puede provocar graves disfunciones cardíacas y del músculo esquelético, así como un crecimiento óseo anómalo (Genuth, 2006). El fosfato inorgánico también actúa como un sistema de amortiguación de hidrogeniones en las diferentes soluciones corporales (Greco y Stabenfeldt, 1999).

### **3.3.3. FACTORES QUE REGULAN LAS CONCENTRACIONES DE FOSFATO**

Las concentraciones de fosfato están controladas por prácticamente los mismos sistemas que regulan las concentraciones de calcio (Greco y Stabenfeldt, 1999).

Sólo una mínima parte del fosfato ingerido es eliminado en las heces combinado con el calcio no absorbido, la mayor parte del fosfato entra en el torrente sanguíneo desde el intestino y posteriormente sufre filtración glomerular. El fosfato es una de las denominadas “sustancias con umbral renal”, es decir, cuando su concentración en el plasma es inferior a un valor crítico la totalidad del fosfato presente en el filtrado glomerular se reabsorbe, pero por encima de esta concentración crítica la tasa de pérdida de fosfato es directamente proporcional a su incremento. Por lo tanto, los riñones regulan la concentración de fosfato en el líquido extracelular alterando su tasa de excreción de acuerdo con la concentración plasmática del mismo (Guyton y Hall, 2006b).

La fosfatemia presenta una exhaustiva regulación endocrina, gran parte de este control ya ha sido citado de forma conjunta al estudiar los factores hormonales que afectan a la homeostasis cálcica, por lo que a continuación sólo resumimos los factores más relevantes:

- La PTH disminuye las concentraciones plasmáticas de fosfato ya que, a pesar de aumentar la resorción de calcio y fosfato desde el hueso y la absorción de estos elementos a nivel intestinal, provoca una fosfaturia renal excesiva. La pérdida rápida

e inmediata de fosfato por la orina obedece a una disminución de la reabsorción tubular proximal del mismo (Guyton y Hall, 2006a).

- La vitamina D eleva la absorción de calcio y fósforo desde el intestino y la reabsorción de estos dos elementos a nivel renal (Rosol *et al.*, 2002), además, facilita la correcta mineralización ósea (Guyton y Hall, 2006a), siendo la presencia de hipofosfatemia un fuerte estímulo para la actividad de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa (Hazewinkel y Tryfonidou, 2002).
- La hormona de crecimiento aumenta la reabsorción tubular renal de fósforo y, supuestamente, contribuye a la disminución de las concentraciones de fósforo en relación a la edad (Willard y DiBartola, 2002).

Seguidamente resumimos una serie de factores que debemos tener en cuenta a la hora de interpretar las concentraciones séricas de este mineral.

La **alimentación** presenta una influencia marcada sobre las concentraciones de fósforo, puesto que:

- Los carbohidratos reducen su concentración sérica, ya que la glucólisis y la formación de intermediarios glucolíticos fosforilados en el músculo, hígado y células adiposas estimulan su desplazamiento hacia el líquido intracelular (LIC) (Willard y DiBartola, 2002).
- El consumo de proteína aumenta su concentración sérica, puesto que dietas ricas en proteína presentan un contenido relativamente alto en fósforo (Willard y DiBartola, 2002).
- La formación de quelatos con cationes, como el calcio y el aluminio, dificulta su absorción a nivel intestinal, afectando de este modo a sus concentraciones (Gómez *et al.*, 2004a).

El **equilibrio ácido-básico** influye tanto sobre la concentración sérica de fósforo como en las pérdidas urinarias del mismo; existen numerosos estudios que han asociado la presencia de acidosis con el aumento de las pérdidas renales de este mineral (Martin y Jones, 1961; Lemann *et al.*, 1966; Lemann *et al.*, 1967; Krapf *et al.*, 1992; Blumberg *et al.*, 1998; Maurer *et al.*, 2003; Lina y Kuijpers, 2004; Kim y Park, 2005; Osther, 2006).

Debido a estos factores que alteran las concentraciones séricas de fósforo, debemos tener en cuenta varias premisas a la hora de efectuar su determinación laboratorial (Willard y DiBartola, 2002):

- Las determinaciones deben realizarse en ayunas: la medición del fósforo sérico después de 12 horas de ayuno minimiza factores causantes las interferencias laboratorias.
- La hemólisis puede afectar a los resultados de laboratorio como consecuencia del fósforo existente en el interior de los eritrocitos. A veces, la hiperlipidemia y la hiperproteinemia causan un cálculo excesivo de la concentración sérica de fósforo dependiendo de la metodología empleada.
- La trombocitosis y la gammopatía monoclonal también pueden causar falsos aumentos de fósforo en el suero.

### **3.4. MAGNESIO**

#### **3.4.1. INTRODUCCIÓN: DISTRIBUCIÓN DEL MAGNESIO CORPORAL**

El magnesio, junto con el calcio, es el principal catión divalente presente en los sistemas biológicos. El magnesio presenta funciones sumamente diferentes a las del calcio, así como una participación más amplia en diversos procesos metabólicos (Hansen, 2002).

Cerca del 50 al 60% del magnesio corporal total se encuentra formando parte de los huesos y sólo aproximadamente la tercera parte de este es intercambiable, sirviendo esta fracción como un reservorio que permite el mantenimiento de sus concentraciones extracelulares. El resto del magnesio presente en el hueso se encuentra íntimamente incorporado en el mismo y, por lo tanto, no es intercambiable (Dhupa y Proulx, 1998; Aranda *et al.*, 2000).

En estudios de difracción de rayos X no se ha visto que los iones de magnesio formen cristales definidos dentro de la estructura ósea. Por tanto, se cree que las sales de magnesio, así como de sodio, potasio y carbonato, están conjugadas con los cristales de hidroxapatita en lugar de organizarse por sí mismas en cristales independientes (Guyton y Hall, 2006a).

La mayor parte del magnesio restante “extraóseo” está situado dentro de las células y menos del 2% del magnesio corporal total está presente en el líquido extracelular (Hansen, 2002). En el caso de este catión, sus reservas intracelulares no proporcionan un reemplazo eficaz a

los cambios agudos en la concentración del líquido extracelular. Es probable que esta observación esté relacionada con el hecho de que la mayor parte del magnesio intracelular está unido a ligandos, lo que hace que no esté fácilmente disponible para el intercambio (Alfrey y Miller, 1973).

El magnesio plasmático aparece en tres estados (Blumberg *et al.*, 1998; Aranda *et al.*, 2000):

- Unido a proteínas (32%), principalmente a la albúmina.
- Formando complejos con aniones (13%), tales como el fosfato inorgánico o el bicarbonato.
- Ionizado (55%).

El magnesio unido a proteínas o el que se encuentra formando complejos con aniones no está disponible para los diferentes procesos bioquímicos, siendo solamente el magnesio ionizado el considerado como biológicamente activo (Blumberg *et al.*, 1998).

### **3.4.2. PRINCIPALES FUNCIONES DEL MAGNESIO**

#### **3.4.2.1. FUNCIONES BIOQUÍMICAS**

Participa en diversas funciones bioquímicas entre las que destacamos:

- El  $Mg^{2+}$ , importante catión intracelular, actúa como cofactor en numerosas reacciones, sobre todo en aquellas en las que hay transferencia de energía a través del ATP (Berne y Levi, 1992). Su función biológica principal consiste en constituir un complejo con el ATP para formar  $Mg^{2+}$ -ATP<sup>2-</sup>. Este complejo es el sustrato efectivo de las trifosfatasa de adenosina, que incluyen a las enzimas encargadas de controlar las concentraciones intracelulares de electrolitos (Hansen, 2002).
- Este catión también es necesario en la formación de nucleótidos difosforilados (NAD), trifosforilados (NADP) y en la síntesis de flavin nucleótidos (FMN y FAD), que participan en el transporte de protones y electrones (Aranda *et al.*, 2000).
- El magnesio es un cofactor necesario en algunos procesos enzimáticos que implican la síntesis y transcripción del ácido desoxirribonucleico (ADN), polimerización de ácido nucleico, fijación de los ribosomas al ácido ribonucleico (ARN) y fosforilación de la glucosa, también está implicado de forma indirecta en el metabolismo oxidante de las mitocondrias (Hansen, 2002).



- Funciona como elemento estabilizador de las membranas celulares ya que forma complejos con los fosfolípidos. Además es también un estabilizador subcelular puesto que mantiene la estabilidad física de ribosomas, de los lisosomas y, dentro del núcleo celular, de los cromosomas (Aranda *et al.*, 2000).

### 3.4.2.2. FUNCIONES FISIOLÓGICAS

- El magnesio es esencial para la transmisión neuromuscular, interviniendo tanto en la excitabilidad neuronal como en la muscular (Berne y Levi, 1992).
- A nivel cardiovascular cuenta con efectos importantes: afecta a la contractibilidad cardíaca y posee efectos cardioprotectores, actuando como antihipóxico y antiisquémico. Además, protege las paredes de los vasos sanguíneos y presenta efecto vasodilatador (Aranda *et al.*, 2002).
- Otras funciones: resulta esencial para el crecimiento y la maduración ósea; participa en el metabolismo mineral; interviene en la transmisión genética; activa la movilidad de los espermatozoides; activa las funciones hepáticas; interviene en la síntesis del surfactante pulmonar; es necesario para la producción de hormonas, e interviene en funciones antialérgicas (Aranda *et al.*, 2002).

### 3.4.3. PRINCIPALES FACTORES QUE REGULAN LAS CONCENTRACIONES DE MAGNESIO

La mayor parte de la entrada de magnesio en el organismo se produce a través del consumo de alimentos que contienen este mineral, a mayores, en algunas áreas, las concentraciones en el agua de consumo proporcionan una fuente importante del mismo (el agua “dura” contiene cerca de 10 a 30 mg/L de magnesio) (Marier, 1982).

Bajo condiciones normales, la mayor parte de la absorción de este catión se realiza en el yeyuno y en el íleon, pero el colon y el recto también presentan capacidad para absorberlo, siendo el desarrollo de hipermagnesemia una de las complicaciones potenciales de la administración de enemas que contienen sulfato de magnesio (Aranda *et al.*, 2000).

Entre los principales factores que regulan su concentración sérica tenemos:

- La dieta: la fracción de magnesio absorbida depende de su concentración en la dieta, promoviendo un consumo dietético bajo un incremento de su absorción fraccional.

Estudios realizados en personas concluyeron que en aquellos individuos que consumen dietas medias se absorbe entre un 30 y un 50% del magnesio (Hansen, 2002). Por otro lado, otros componentes de la ración como son el calcio, ácidos grasos, fitato, oxalato, fosfato y fibra pueden fijarlo e interferir en su absorción ya que forman con el magnesio compuestos insolubles (Spencer *et al.*, 1980).

- Factores hormonales: no existe un mecanismo hormonal simple encargado de controlar el transporte intestinal de dicho mineral. Aunque algunos autores afirman que la vitamina D y sus metabolitos activos pueden favorecer su absorción (Hansen, 2002). Otros autores han obtenido resultados contradictorios no pudiendo demostrar en sus estudios la participación de esta hormona en la absorción de dicho elemento (Aranda *et al.*, 2000).
- Parece ser que una deficiencia en vitamina B<sub>1</sub> y B<sub>6</sub> produce un descenso en el transporte intestinal de magnesio (Aranda *et al.*, 2000).

El exceso de magnesio corporal es excretado en la orina. Los riñones son esenciales para el control fisiológico del equilibrio de este elemento puesto que son los encargados del mantenimiento de su concentración plasmática dentro de límites estrechos. Las dos terceras partes del magnesio que llega a los glomérulos pasan al interior del filtrado glomerular y la mayoría se reabsorbe en la rama gruesa ascendente del asa de Henle (Hansen, 2002). La hormona paratiroidea, la vitamina D, la presencia de hipocalcemia y la depleción del volumen intravascular incrementan la reabsorción renal de magnesio; mientras que los diuréticos, la presencia de hipercalcemia o hipofosfatemia y la sobrecarga de volumen intravascular, ejercen el efecto contrario (Sarko, 2005). En animales de experimentación se ha comprobado que la presencia de acidosis metabólica incrementa la excreción de magnesio a través de la orina, mientras que la alcalosis metabólica, originada tras la administración de bicarbonato, parece estimular directamente la reabsorción tubular de este catión (Ariceta *et al.*, 2004).

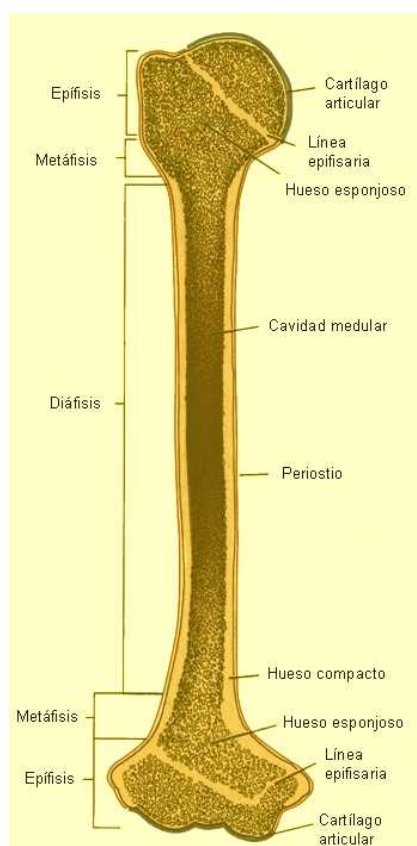
### 3.5. EL HUESO

El hueso es un tejido conectivo que consiste esencialmente en una matriz extracelular mineralizada y células especializadas: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Arnett, 2004).

El principal componente orgánico de la matriz es el colágeno tipo I, que supone alrededor del 90%; el 10% restante lo componen pequeñas cantidades de proteoglicanos, lípidos y una serie de proteínas no estructurales de menor tamaño, entre las que se encuentran la

osteocalcina, osteonectina, algunas fosfoproteínas, sialoproteínas, factores de crecimiento y proteínas séricas (Green y Kleeman, 1991; Arnett, 2004).

La fase inorgánica está compuesta por minúsculos cristales de un mineral de carácter alcalino, la hidroxiapatita. Estos cristales están dispuestos entre las fibras de colágeno para formar un material que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia (Arnett, 2004).



**Figura 6:** Estructura de un hueso largo típico (Figura extraída de Ross *et al.* (2003) y adaptada para esta memoria de tesis doctoral)

La fórmula general de los cristales de apatita es la siguiente:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$ . En el mineral óseo  $\text{X}=\text{OH}$  y por tanto se acuña el término de hidroxiapatita. Los cristales de hidroxiapatita son extremadamente pequeños, de modo que representan una enorme área de superficie (de 100 a 200  $\text{m}^2$ ) por gramo de hueso. La hidroxiapatita del hueso, de forma general, es bastante impura, pues en el momento de su formación algunos de sus iones constituyentes pueden ser reemplazados por otros aproximadamente del mismo radio. Este hecho produce defectos mínimos en la forma de los cristales que no afectan a la estructura en su conjunto. Así, en la posición del calcio puede aparecer plomo, manganeso, sodio, magnesio y estroncio; mientras que el carbonato ( $\text{CO}_3^-$ ) puede sustituir al grupo fosfato o a los iones hidroxilo. Es importante destacar que el esqueleto contiene el 99% del calcio, el 85%

del fósforo, el 35% del sodio, el 80% del carbonato, el 80% del citrato y el 60% del magnesio corporal (Green y Kleeman, 1991).

A pesar de su resistencia y dureza, que le permiten desempeñar sus funciones de sostén y actuar como cubierta protectora, el hueso es un material vivo que está sometido a un proceso de renovación constante durante toda la vida y presenta funciones metabólicas muy importantes (Fawcett y Jensh, 1999). Una vez formado, los minerales que componen este tejido no son secuestrados de forma irreversible sino que pueden ser movilizados por diferentes mecanismos, lo que le permite al hueso responder a exigencias metabólicas, nutritivas y endocrinas (Banks, 1986; Fawcett y Jensh, 1999).

El hueso está recubierto externamente por una túnica llamada periostio, que consiste en una capa externa de tejido conectivo denso fibroso (Gartner y Hiatt, 1997) ausente a nivel del cartílago articular y en los puntos de inserción de tendones y ligamentos. Esta cubierta consta de dos capas: una fibrosa externa, cuya función primaria es distribuir el riego sanguíneo y la inervación hacia el hueso, y una cubierta o envoltura celular interna, que posee células osteoprogenitoras (Fawcett y Jensh, 1999). El anclaje óseo del periostio se realiza a través de las fibras de Sharpey (Gartner y Hiatt, 1997). Tapizando la superficie interna aparece el endostio, que a diferencia del periostio está formado por una única capa de células osteoprogenitoras planas, las cuales, participan de manera decisiva junto con las células de la capa osteogénica del periostio en la reparación de las fracturas óseas (Gómez *et al.*, 2004b).

### 3.5.1. HISTOGÉNESIS DEL HUESO

El hueso se desarrolla siempre por sustitución a partir de un tejido conjuntivo preexistente. En el embrión, se observan dos modos de osteogénesis, la intramembranosa y la endocondral. En el caso de la osificación intramembranosa la formación del hueso tiene lugar directamente a partir del tejido conjuntivo primitivo; mientras que en la osificación endocondral se realiza a partir de un cartílago que se forma previamente (Bloom y Fawcett, 1995).

La formación de los huesos de la columna vertebral, la pelvis y las extremidades presentan osificación endocondral (Bloom y Fawcett, 1995). Las células mesenquimatosas de los esbozos embrionarios de estas estructuras se diferencian y forman un cartílago avascular rudimentario que es invadido por vasos sanguíneos, apareciendo posteriormente osteoblastos que comienzan a depositar hueso sobre el molde temporal de cartílago. Al ir avanzando este proceso, en las proximidades de los extremos del hueso se va formando una zona de cartílago proliferante, llamada placa de crecimiento (Olsen, 1999; Arnett, 2004).

Los huesos planos de la mandíbula y del cráneo (frontal, parietales, occipitales y temporales) están sujetos a osificación intramembranosa, es decir, se forman directamente por la diferenciación del mesénquima embrionario hacia la línea osteoblástica sin aparición intermedia de cartílago (Arnett, 2004).

### 3.5.2. COMPOSICIÓN DEL HUESO

El tejido óseo está constituido por células vivas rodeadas de una matriz intercelular amorfa mineralizada y reforzada por la existencia de fibras de colágeno. Dichas fibras son producidas por las propias células óseas (Gómez *et al.*, 2004b).

#### 3.5.2.1. CÉLULAS

A continuación, nos referiremos brevemente a los diferentes tipos celulares que aparecen en el tejido óseo centrándonos, principalmente, en sus funciones y no en su morfología:

**Células osteoprogenitoras u osteogénicas:** se originan a partir de las células mesenquimatosas primitivas. Son células fusiformes localizadas en las superficies óseas que no están sufriendo el proceso de resorción, de modo que constituyen la capa más profunda del periostio y también aparecen en el endostio delimitando las cavidades medulares. Además, las células osteoprogenitoras tapizan las paredes de los conductos de Havers, responsables de conducir al interior del hueso los vasos sanguíneos que regulan el aporte de oxígeno y nutrientes, y se encargan de la eliminación de desechos (Gómez *et al.*, 2004b). La presencia de este tipo celular asegura la existencia de un número adecuado de osteoblastos necesarios para el crecimiento, mantenimiento, remodelación y reparación del hueso (Banks, 1986).

**Osteoblastos:** están situados sobre la superficie del hueso siguiendo una distribución de tipo laminar de células cuboides (Gartner y Hiatt, 1997). Son las células responsables de la neoformación ósea, puesto que encargan de producir el colágeno y otros componentes orgánicos de la matriz del hueso (osteocalcina, osteonectina, glucosaminoglicanos), además de actuar como células de almacén del calcio utilizado durante el proceso de mineralización. La actividad secretora de los osteoblastos es bifásica (Banks, 1986):

- La primera fase implica la síntesis y secreción de los elementos orgánicos de la matriz ósea que en conjunto se conocen como osteoide.

- La segunda fase supone la mineralización del osteoide. Para ello, van a emplear los iones de calcio almacenados en su interior.

Además de intervenir en los procesos de producción de los componentes orgánicos de la matriz, los osteoblastos son responsables de sintetizar distintas citocinas y factores de crecimiento. Dichas moléculas tienen un importante efecto local en los procesos de formación y resorción del hueso. Entre estos factores cuentan con especial interés:

- Varias interleucinas que participan fundamentalmente en los procesos de resorción ósea al estimular la formación de los osteoclastos.
- Las proteínas modeladoras óseas como las prostaglandinas y diversos factores de crecimiento (IGF-1 o el TGF- $\beta$ ), estos últimos estimulan la maduración final de los osteoblastos y provocan un aumento en la formación del hueso.

La producción de todos estos factores está sometida al control de una serie de hormonas circulantes entre las que destacan la paratohormona y la vitamina D (Gómez *et al.*, 2004b). Cuando la PTH se fija a sus receptores en los osteoblastos provoca la liberación de un factor estimulante de los osteoclastos y de colagenasa, dicha enzima hidroliza el osteoide con el fin de favorecer el contacto de los osteoclastos con la matriz mineralizada del hueso. Todo ello apoya la hipótesis que atribuye a los osteoblastos un papel programador o intermediario en la resorción ósea (Fawcett y Jensch, 1999).

En el momento en el que la neoformación ósea cesa, los osteoblastos pueden seguir dos caminos: bien quedan englobados en la matriz osteoide como osteocitos o bien derivan a osteoblastos inactivos (Gartner y Hiatt, 1997).

**Osteocitos:** son las células óseas maduras, derivadas de los osteoblastos, que están albergadas en lagunas dentro de la matriz ósea calcificada (Gartner y Hiatt, 1997). De manera general, podemos decir que los osteocitos se disponen formando capas o láminas para dar lugar una estructura denominada osteona o sistema de Havers, que es considerada la unidad funcional del tejido óseo (Gómez *et al.*, 2004b). De las lagunas parten radialmente unos canalículos que están ocupados por prolongaciones citoplasmáticas de los osteocitos formando una extensa red de comunicación entre estas células, lo que facilita la coordinación de su actividad (Fawcett y Jensch, 1999). Del mismo modo, existen contactos similares con los osteoblastos que permiten una actividad coordinada de la denominada bomba osteocito-osteoblasto, que como hemos visto constituye un mecanismo importante para el mantenimiento de los niveles plasmáticos de calcio (Dellmann, 1993).

Los osteocitos son responsables del mantenimiento de la matriz ósea mediante la síntesis y secreción de diferentes componentes de la matriz, aunque en menor cantidad que los osteoblastos. Además poseen enzimas lisosomales que les permiten la resorción de hueso perilagunar. Este proceso es conocido con el nombre de osteolisis-osteocítica y supone un dispositivo interesante para el mantenimiento de los niveles plasmáticos de calcio (Banks, 1986).

**Osteoclastos:** son células grandes y multinucleadas encargadas de digerir y degradar el hueso. Estas células se forman a partir de progenitoras que pertenecen a la línea de los monocitos y de los macrófagos, los cuales llegan al tejido mediante un proceso de migración desde el torrente sanguíneo (Gómez *et al.*, 2004b). Los precursores osteoclásticos están presentes en la médula ósea y tras una sucesión de etapas, a lo largo de las cuales adquieren sus características fenotípicas y funcionales, proliferan y se fusionan hasta dar lugar a osteoclastos con capacidad resortiva (Mentaverri *et al.*, 2000).

Respecto a su ubicación es importante señalar que están localizados siempre en las superficies de resorción ósea donde forman una especie de monocapa (Gómez *et al.*, 2004b). En este emplazamiento, los osteoclastos ocupan unas cavidades poco profundas llamadas lagunas de Howship o bahías de resorción, producidas por la degradación del hueso por parte de los osteoclastos presentes en las lagunas adyacentes (Fawcett y Jensh, 1999; Gómez *et al.*, 2004b).

Los osteoclastos desempeñan un papel fundamental en la remodelación ósea que tiene lugar en los procesos de crecimiento y reparación del hueso, también están asociados a la eliminación de distintas porciones de matriz ósea alteradas o debilitadas (Gómez *et al.*, 2004b). Estas células poseen los medios necesarios para la disolución del hueso calcificado así como para la digestión de la matriz orgánica. Dichas acciones las llevan a cabo mediante la liberación de ácidos orgánicos (lactato, citrato) que disminuyen el pH en el entorno de la célula disolviendo la porción mineralizada del tejido óseo. Además la disminución del pH incrementa la actividad de las enzimas lisosomales que participan en la degradación de la matriz orgánica del hueso (Banks, 1986).

Durante mucho tiempo, los osteoclastos fueron considerados los únicos responsables de la resorción ósea. Sin embargo, sólo son eficaces si están en contacto directo con la matriz ósea mineralizada, por este motivo precisan de la actividad previa de los osteoblastos encargados de eliminar la capa superficial de osteoide que suele recubrir la porción mineralizada de la matriz ósea (Fawcell y Jensh, 1999). Además, la actividad de los

osteoclastos está regulada fundamentalmente mediante la acción de distintas citoquinas liberadas por los osteoblastos (IL-1, IL-6 e IL-11) (Gómez *et al.*, 2004b).

### 3.5.2.2. MATRIZ ÓSEA

La matriz ósea tiene dos componentes fundamentales, las sales inorgánicas y la matriz orgánica, responsables de conferir al hueso sus propiedades físicas. Las sales inorgánicas, fundamentalmente sales de calcio insolubles, le confieren dureza, mientras que la presencia de fibras de colágeno, principalmente colágeno tipo I, proporcionan al hueso cierto grado de elasticidad y, por tanto, aumentan su resistencia a las fuerzas de tensión (Gómez *et al.*, 2004b).

**Matriz orgánica (osteóide):** constituye aproximadamente el 35% del peso seco del hueso. Consiste en fibras que son casi exclusivamente de colágeno tipo I (Gartner y Hiatt, 1997), que se orientan a lo largo de las líneas de estrés (Blair, 1998).

El colágeno tipo I constituye cerca del 90% del componente orgánico del hueso, se dispone en grandes haces (50 a 70 nm de diámetro) que manifiestan la periodicidad característica de 67  $\mu\text{m}$ , su elevado grado de entrecruzamiento impide que sea extraído con facilidad (Gartner y Hiatt, 1997).

En esta matriz orgánica también están presentes glucosaminoglicanos sulfatados como el condroitín y queratán sulfato, y las proteínas específicas del hueso que son la osteocalcina, osteonectina, osteopontina y sialoproteínas (Young y Health, 2000; Gartner y Hiatt, 1997). La osteocalcina está implicada en la unión del calcio a la matriz orgánica durante el proceso de mineralización; la osteonectina sirve como punto de anclaje entre el colágeno y la matriz inorgánica; la osteopontina se fija a la hidroxiapatita pero presenta, a mayores, lugares adicionales de fijación en otros componentes, y la sialoproteína ósea presenta sitios de fijación para los componentes de la matriz y para las integrinas de osteoblastos y osteocitos, lo que sugiere su participación en la adhesión de estas células a la matriz ósea (Gartner y Hiatt, 1997; Young y Health, 2000; Gómez *et al.*, 2004b).

Hasta que la matriz orgánica del hueso se calcifica, el tejido presente en el mismo se conoce con el nombre de tejido osteóide o prehueso. Para que este tejido se calcifique es necesario que las concentraciones locales de iones de calcio y fosfato en el hueso alcancen unos valores adecuados; de este modo se producirá el depósito de las sales de fosfato cálcico sobre la mencionada matriz (Gómez *et al.*, 2004b).



**Matriz inorgánica:** constituye cerca del 65% del peso seco del hueso. Está compuesta principalmente por calcio y fósforo, junto con otros componentes como bicarbonato, citrato, magnesio, sodio y potasio (Banks, 1986; Gartner y Hiatt, 1997). También muestra gran afinidad por metales pesados y ciertos contaminantes radioactivos presentes en el ambiente (Young y Heath, 2000).

El calcio y el fósforo se encuentran principalmente formando cristales de hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$ ; sin embargo, también se constituyen en cristales amorfos de fosfato de calcio. Los iones más superficiales de estos cristales atraen agua y forman una capa de hidratación que permite el intercambio de los mismos con el líquido extracelular (Fawcett y Jenhs, 1999; Gartner y Hiatt, 1997).

### 3.5.3. TIPOS DE HUESO

El tejido óseo se clasifica en dos grupos en función de su grado de madurez:

**Hueso inmaduro (primario, fibrosos o entretejido):** Presenta una elevada celularidad y las lagunas son muy grandes y redondas. Tanto las fibras de colágeno como las células se distribuyen al azar. La matriz orgánica está menos mineralizada que en el hueso maduro y tiene predilección por los colorantes básicos (Banks, 1986).

El hueso inmaduro se constituye cuando los osteoblastos producen osteoide de manera rápida, como ocurre en el desarrollo fetal y, en los adultos, cuando existen procesos que se acompañan de una elevada remodelación o reparación ósea (Young y Health, 2000). Bajo condiciones normales, este tejido es temporal y va a ser reemplazado por el hueso maduro (Banks, 1986).

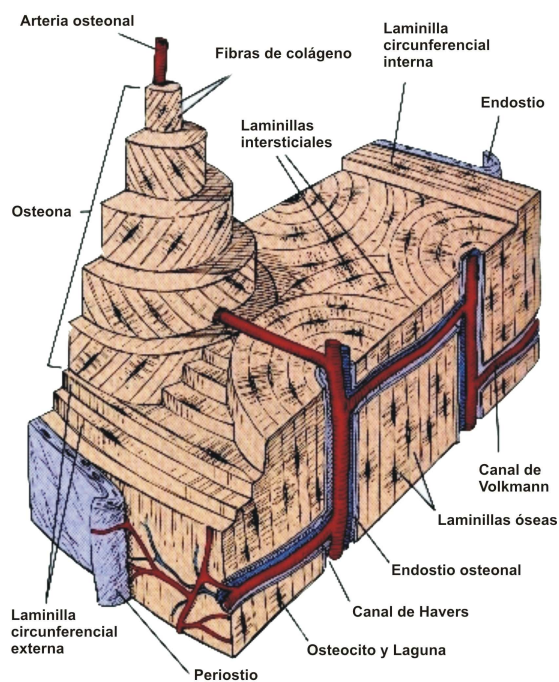
**Hueso maduro (secundario o laminar):** Muestra una menor celularidad, las lagunas son de menor tamaño y presentan una forma lenticular. La distribución tanto de las células como fibras de colágeno sigue un patrón predeterminado y la matriz orgánica se tiñe con colorantes ácidos (Banks, 1986). Teóricamente la práctica totalidad del hueso en un animal adulto sano debería ser tejido óseo maduro.

Las dos formas más comunes del tejido óseo maduro son las siguientes:

- **Hueso compacto o cortical:** comprende el 85% del esqueleto, es fuerte, sólido y bien organizado (Sarko, 2005). Está localizado en la diáfisis de los huesos largos, en las láminas externa e interna de los huesos planos y en la periferia de los huesos

cortos. Los componentes estructurales básicos del tejido óseo compacto son las osteonas o sistemas de Havers que son unidades cilíndricas dispuestas de forma paralela al eje largo del hueso (Dellmann, 1993; Young y Heath, 2000).

Cada osteona está compuesta de entre 4 y 15 laminillas de matriz ósea calcificadas dispuestas de forma concéntrica alrededor de un conducto central que contiene capilares, vasos linfáticos y fibras nerviosas amielínicas sustentadas por tejido conjuntivo reticular (Fawcett y Jensh, 1999). Los haces neurovasculares establecen interconexiones entre sí y con el endostio y el periostio a través de los canales de Volkmann, que atraviesan las columnas formando ángulos rectos (u oblicuos) con los canales de Havers (Young y Heath, 2000; Gómez *et al.*, 2004b).



**Figura 7:** Diagrama de un hueso compacto en sección. Las láminas concéntricas y el canal haversiano constituyen la osteona (Dibujo extraído de Ross *et al.* (2003) y adaptado para esta memoria de tesis doctoral)

Los sistemas de Havers comienzan como un tubo ancho en cuya periferia se sitúan osteoblastos encargados de la síntesis de las laminillas óseas. A medida que se depositan más capas de hueso, el diámetro del canal central disminuye y los osteoblastos quedan atrapados como osteocitos en lagunas de la matriz ósea. De esta forma, los osteocitos se disponen en anillos concéntricos en las laminillas. Entre las lagunas adyacentes y el canal central se desarrollan diminutos canales de conexión llamados canalículos que contienen las finas prolongaciones citoplasmáticas de los osteocitos (Young y Heath, 2000).

La continua remodelación ósea hace que las osteonas neoformadas se dispongan en medio de las anteriores, parcialmente resorbidas, dando lugar a sistemas intersticiales irregulares entre sistemas de Havers intactos (Young y Heath, 2000).

Las laminillas de hueso compacto (circunferenciales externa e interna) también están localizadas en la superficie ósea recubriéndola bajo el periostio y el endostio (Young y Heath, 2000).

- **Hueso esponjoso o trabecular:** está presente en las epífisis de los huesos largos y en la parte central de los planos y cortos (Gartner y Hiatt, 1997), comprendiendo en torno a un 15% del esqueleto (Sarko, 2005). En este tipo de hueso, los osteocitos también se disponen en láminas constituyendo un tipo particular de osteona llamada “osteona trabecular” que presenta una distribución diferente al sistema de Havers, ya que en ella no se observa la presencia de conductos de Havers ni de Volkmann por los que discurren los vasos sanguíneos. La “osteona trabecular” presenta una forma discoidal compuesta por unas 20 láminas dispuestas de forma paralela a la superficie del disco. Al carecer de conductos de Havers, la nutrición de los osteocitos situados en las láminas de la osteona trabecular se realiza por difusión a partir de la superficie cubierta por endostio y a través de un sistema de canalículos comunicantes relacionados (Gómez *et al.*, 2004b).

Esta variante del tejido óseo posee una gran superficie e irrigación sanguínea, este hecho hace que se considere muy importante en el mantenimiento de la homeostasis mineral (Gartner y Hiatt, 1997).

### 3.5.4. EL RECAMBIO ÓSEO O REMODELADO DEL HUESO

El hueso es un importante y dinámico depósito de calcio y de fósforo (Genuth, 2006). Durante la vida adulta, el esqueleto experimenta un proceso continuo de reparación y renovación que puede afectar hasta al 15% de la masa ósea total por año (Arnett, 2004). Este remodelado permanente resulta de las actividades de dos tipos celulares: los osteoblastos que la sintetizan y los osteoclastos que la degradan, estas dos actividades están estrechamente ligadas en el tiempo y en el espacio (Mentaverri *et al.*, 2000).

La formación del hueso tiene lugar en la superficie externa del hueso cortical mientras que la resorción ósea se produce en su superficie interna. Tanto la formación como la resorción tienen lugar también en canales de nutrientes especializados dentro del hueso cortical y en

las superficies del hueso trabecular. A lo largo de la vida los procesos de formación y de resorción ósea están estrechamente regulados (Genuth, 2006).

#### **3.5.4.1. FORMACIÓN DEL HUESO**

La fase inicial de la formación de hueso consiste en la secreción de moléculas de colágeno (denominadas monómeros de colágeno) y de sustancia fundamental (sobre todo proteoglucanos) por los osteoblastos. Los monómeros se polimerizan con rapidez para formar fibras de colágeno que darán lugar al osteoide, material parecido al cartílago pero que difiere de este en la facilidad con que las sales de calcio precipitan sobre él (Guyton y Hall, 2006c). La osteocalcina y la osteonectina, también secretadas por los osteoblastos, regulan la calidad y la cantidad del hueso que se forma (Genuth, 2006). En pocos días tras la formación del osteoide, comienzan a precipitar sales de calcio sobre las superficies de las fibras colágenas. El precipitado aparece primero con intervalos a lo largo de cada fibra de colágeno, formando diminutos nidos que se multiplican enseguida y crecen durante días o semanas para formar el producto final, los cristales de hidroxiapatita (Guyton y Hall, 2006c). Cuando se acumula hueso completamente mineralizado alrededor del osteoblasto la célula encerrada pierde la mayor parte de su actividad sintética y se convierte en un osteocito interior. Por tanto, la actividad osteoblástica se observa sólo en las superficies óseas junto a células en reposo que esperan su activación (Genuth, 2006).

Las sales de calcio que se depositan primero no son cristales de hidroxiapatita sino compuestos amorfos (no cristalinos) constituidos por una mezcla de sales como  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y otros. Después por un proceso de sustitución y adición de átomos o de resorción y nueva precipitación, estas sales se convierten en cristales de hidroxiapatita a lo largo de un periodo de semanas o meses. Sin embargo, un pequeño porcentaje puede persistir en forma amorfa. Este aspecto es importante porque las sales amorfas pueden resorberse con mayor rapidez cuando existe una necesidad adicional de calcio en el LEC (Guyton y Hall, 2006c).

El proceso de mineralización requiere, indispensablemente, de unas concentraciones plasmáticas normales de calcio y de fosfato (Genuth, 2006).

En cada osteona existen minúsculos conductos con contenido líquido llamados canalículos que atraviesan el hueso mineralizado; a través de estos conductos y de las prolongaciones celulares sincitiales, los osteocitos interiores se mantienen conectados con las células de revestimiento superficial. Los osteocitos parecen actuar como mecanosensores que detectan

el debilitamiento óseo y estimulan su reparación mediante eliminación y sustitución (Genuth, 2006).

### 3.5.4.2. RESORCIÓN ÓSEA

La resorción ósea es necesaria en muchos procesos esqueléticos. Se trata de un evento obligatorio durante el crecimiento óseo, la erupción dental y la reparación de fracturas; siendo también imprescindible para el mantenimiento de unos niveles adecuados del calcio sanguíneo (Li *et al.*, 2006). Pero el proceso de resorción ósea no se limita a extraer calcio, sino que destruye también la matriz orgánica reduciendo así la masa ósea madura. La principal célula responsable de este proceso es el osteoclasto, una célula gigante multinucleada formada por la fusión de varios precursores (Genuth, 2006).

Histológicamente, la resorción de hueso se produce en la inmediata vecindad a los osteoclastos. Se cree que el mecanismo de resorción es el siguiente: los osteoclastos emiten proyecciones análogas a vellosidades hacia el hueso que secretan dos tipos de sustancias: 1) enzimas proteolíticas, liberadas de los lisosomas de los osteoclastos, y 2) varios ácidos, como el ácido cítrico y el ácido láctico, liberados por las mitocondrias y las vesículas secretoras. Las enzimas digieren o disuelven la matriz orgánica del hueso liberando fragmentos peptídicos resultantes de la degradación del colágeno; mientras que los ácidos disuelven las sales óseas (Guyton y Hall, 2006c). Durante este proceso de resorción, el osteoclasto excava literalmente un camino en el hueso mineralizado. El calcio, el fosfato y el magnesio, las piridinolinas y piridinios (productos fluorescentes de los enlaces cruzados de colágeno), los N-telopéptidos del colágeno y los aminoácidos constituyentes (entre ellos, hidroxiprolina e hidroxilisina, que sólo se encuentran en el colágeno) se liberan al líquido extracelular, reflejando las concentraciones urinarias de estos productos orgánicos la tasa de resorción ósea (Genuth, 2006).

La destrucción de hueso está estrechamente controlada *in vivo* por factores hormonales y celulares que afectan no sólo a la actividad de los osteoclastos sino también a la formación de los mismos. La PTH y la 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> incrementan la resorción ósea, por el contrario, el aumento de los niveles de calcio en el espacio de resorción inicia la liberación de los osteoclastos desde la superficie ósea, lo que conlleva el fin de dicho proceso en ese punto (Li *et al.*, 2006). Finalmente, está descrita la muerte de los osteoclastos a través de un proceso de apoptosis, de modo que el control sobre la apoptosis puede representar un paso clave en la regulación de la resorción ósea (Kameda *et al.*, 1995). Más recientemente

Mentaverri *et al.* (2000) realizaron un estudio experimental con osteoclastos aislados y con poblaciones heterogéneas de hueso que simulaban el ambiente óseo, poniendo de evidencia la influencia directa del ambiente celular y en particular de los osteoblastos sobre la supervivencia de los osteoclastos. Los osteoblastos parecen secretar una o más sustancias capaces de disminuir la supervivencia de los osteoclastos. Además, mostraron por primera vez que estos productos de secreción son controlados por el calcitriol que estimula la resorción ósea no solamente favoreciendo la diferenciación osteoclástica, sino también inhibiendo la apoptosis de los osteoclastos.

### **3.5.4.3. SINCRONIZACIÓN ENTRE LA RESORCIÓN Y LA FORMACIÓN ÓSEA**

Existe una gran coordinación local entre la resorción y la formación ósea. En condiciones de esfuerzos mecánicos normales los osteocitos producen osteoprotegerina, una molécula que inhibe la remodelación ósea al suprimir las células osteoclásticas. Sin embargo, cuando el hueso se debilita o fatiga, los osteocitos lo detectan y, a continuación, estimulan los osteoblastos de revestimiento en reposo para que recluten y activen osteoclastos mediante procesos de señalización paracrina. La cavidad de resorción resultante creada por el osteoclasto en el hueso debilitado se convierte después en una zona de actividad osteoblástica, de modo que se rellena la cavidad recién formada con nuevo hueso más resistente. Por tanto, la resorción ósea osteoclástica precede y desencadena la posterior formación de hueso de sustitución por los osteoblastos. Sin embargo, toda la secuencia de remodelado óseo comienza con señales de los osteocitos y de los osteoblastos de revestimiento (Genuth, 2006).

El reclutamiento de osteoblastos y osteoclastos a partir de precursores y la actividad de cada tipo celular están regulados por diversos factores locales, como linfocinas, citocinas, factores de crecimiento y de transformación tisular, prostaglandinas, anexinas, osteoprotegerina y diversas hormonas (Blair, 1998; Genuth, 2006). En general, tanto si el efecto primario de una hormona es sobre la formación como sobre la resorción ósea, el fenómeno de acoplamiento hará que el proceso contrario se modifique secundariamente en la misma dirección. Por tanto, el efecto neto de un defecto o deficiencia hormonal dependerá en parte de la medida en que el fenómeno de acoplamiento proteja la masa ósea total. Como consecuencia del envejecimiento el equilibrio se desplaza hacia la resorción y la masa ósea disminuye (Genuth, 2006).

Actualmente, y todavía por mecanismos no comprendidos totalmente, existen autores que han descrito que bajo determinadas circunstancias tiene lugar un desacoplamiento entre formación y resorción ósea.

1. HORMONAS	
PTH	<p>↑ formación y actividad osteoclastos; ↑ proliferación y actividad osteoblastos → ↑ recambio óseo</p> <p>PTH intermitente: ↑ formación ósea <i>in vivo</i></p> <p>PTH altas dosis continuadas: ↑ resorción ósea → pérdida de hueso</p>
1,25(OH) <sub>2</sub> vitamina D	<p>↑ formación y actividad de los osteoclastos; ↓ proliferación de los osteoblastos; ↑ diferenciación de los osteoblastos</p> <p>Necesaria para la mineralización de la matriz: deficiencia → osteomalacia, raquitismo</p>
Calcitonina	↓ formación y actividad de los osteoclastos
Glucocorticoides	<p>Necesarios para el desarrollo y función normales del hueso</p> <p>Exceso → pérdida de hueso/osteoporosis</p>
GH	Necesaria para el crecimiento normal del esqueleto
Hormonas sexuales (estrógenos y andrógenos)	<p>↓ formación y actividad de los osteoclastos; ↑ aumentan la actividad de los osteoblastos (posible)</p> <p>Deficiencia: ↑ recambio, osteoporosis</p>
2. FACTORES LOCALES (paracrinos y autocrinos)	
Factores de crecimiento y citocinas	Efectos variables sobre la formación y actividad de osteoclastos y osteoblastos
Otras moléculas	<p>Prostaglandinas: ↑ reclutamiento osteoclastos, ↑ ↓ actividad osteoclastos</p> <p>Leucotrienos: ↑ formación y actividad osteoclastos</p> <p>ATP extracelular: ↑ formación y actividad osteoclastos, ↓ actividad osteoblastos</p> <p>Bradicinina: ↑ formación y actividad osteoclastos</p> <p>Péptido relacionado con el gen de la calcitonina: ↓ formación y actividad osteoclastos</p>
3. AGENTES INORGÁNICOS (locales y sistémicos)	
H <sup>+</sup> extracelulares (pH<7,2)	↑ actividad osteoclastos, ↓ actividad osteoblastos
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	↓ formación y actividad osteoclastos
Ca <sup>2+</sup>	↓ formación y actividad osteoclastos (efecto limitado)
Sr <sup>2+</sup>	↑ formación ósea
F <sup>-</sup>	↑ formación ósea
Hipoxia	↑ formación osteoclastos, ↓ función osteoblastos
Óxido nítrico	↑ ↓ formación y actividad osteoclastos, ↑ ↓ actividad osteoblastos; necesario para el remodelado normal, interviene en la respuesta a las cargas mecánicas
4. EFECTOS MECÁNICOS	
Cargas regulares cíclicas	↑ actividad osteoblastos, formación ósea, remodelado adaptativo
Ausencia de carga (postración, ingravidez)	↑ formación y actividad de osteoclastos
Grandes cambios en presión hidrostática	↑ muerte de osteocitos

**Tabla 9:** Regulación de la actividad de las células óseas (Arnett, 2004)

### 3.5.5. MARCADORES ÓSEOS

En el proceso de remodelación ósea se produce un equilibrio dinámico en el cual los procesos de resorción y formación del hueso se encuentran fuertemente acoplados. Las alteraciones en alguno de estos dos procesos provoca cambios en la distribución, en la cantidad y en la calidad del hueso en el esqueleto (Allen *et al.*, 2000b). Existen diversas técnicas, sobre todo de diagnóstico por imagen, que pueden emplearse para el diagnóstico de patologías del hueso; por ejemplo, las radiografías pueden ser empleadas para identificar regiones de osteopenia, pero sólo cuando existe una reducción relativamente grande (30% o más) de la densidad ósea (Genant *et al.*, 1996). Actualmente se están comenzando a emplear en veterinaria métodos más sofisticados como la tomografía computarizada cuantitativa, resonancia magnética y densitometrías (a fotón único y dual) que han mejorado nuestra capacidad para identificar y cuantificar las alteraciones sistémicas y regionales del contenido mineral óseo (CMO) o de la densidad mineral ósea (DMO). Algunas de estas técnicas están ya disponibles en centros de referencia veterinarios de EEUU, pero en la práctica general las consideraciones económicas limitan su uso. La utilidad de estos medios está, además, limitada por el hecho de que sólo miden el balance óseo neto en un momento específico de tiempo, siendo imposible obtener información temporal con un único examen o diferenciar entre alteraciones en la formación y alteraciones en la resorción como causas del cambio en el CMO o en la DMO (Allen *et al.*, 2000b).

Las limitaciones descritas en las técnicas de diagnóstico por imagen junto a los avances en la comprensión de los mecanismos celulares y bioquímicos de la remodelación del hueso han llevado a la identificación de marcadores específicos de formación y de resorción ósea. Estas sustancias pueden ser cuantificadas en suero o en orina mediante técnicas de ELISA (ensayo inmunoenzimático) o RIA (radioinmunoensayo). La determinación de estos marcadores ofrece muchas ventajas en la práctica clínica (Pagani *et al.*, 2005) puesto que son pruebas sencillas, económicas, ausentes de riesgo para el paciente, no influenciadas por cambios en el metabolismo no-óseo y que pueden repetirse con frecuencia permitiendo la identificación de cambios en cortos espacios de tiempo (Allen *et al.*, 1998; Pagani *et al.*, 2005). Este conjunto de características las convierte en técnicas ideales para el diagnóstico y el manejo de enfermedades esqueléticas (Allen *et al.*, 1998).



En general, en medicina veterinaria, la determinación de marcadores que miden la actividad de las células óseas se reduce casi de forma exclusiva a la investigación, aunque cada vez son más los trabajos que describen sus potenciales aplicaciones clínicas en los animales de compañía, particularmente en perro y en caballo (Allen *et al.*, 2000b; Price *et al.*, 2001).

En 1998, Allen *et al.* determinaron los rangos de referencia de ciertos marcadores tanto de formación como de resorción ósea en perros beagle de diferentes grupos de edad. Además en el mismo estudio validaron ensayos comercializados para la determinación de las concentraciones de dichos marcadores en medicina humana para su uso en veterinaria. Seis años después, Breur *et al.* comprobaron que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de marcadores óseos entre dos razas de perro de tamaño muy diferente, ratificando, además, que los valores obtenidos en ambos grupos se encontraban dentro de los rangos de referencia dados por Allen *et al.* en 1998. De modo que las concentraciones de referencia descritas para diferentes grupos de edad en perros beagle pueden generalizarse para cualquier raza de perros, lo que facilita en gran medida el uso clínico de dichos marcadores.

### **3.5.5.1. MARCADORES DE LA FORMACIÓN ÓSEA**

Los marcadores óseos se subdividen en marcadores enzimáticos y productos metabólicos originados durante la formación o la resorción del hueso (Theyse *et al.*, 2006). En el caso de los marcadores séricos de formación ósea reflejan, o bien, la actividad osteoblástica como es el caso de la fosfatasa alcalina específica del hueso y de la osteocalcina, o bien, modificaciones de la molécula de procolágeno tipo 1, por ejemplo los propéptidos terminales de procolágeno tipo I (Allen *et al.*, 2000b).

#### **3.5.5.1.1. FOSFATASA ALCALINA (FA)**

Se trata de una proteína unida a membrana que es sintetizada por células en gran variedad de tejidos. En el hombre se han identificado cuatro isoenzimas, la expresión de tres de ellas es específica de tejidos (intestino, placenta y células germinales). La cuarta isoenzima es la FA no específica de tejidos, y aunque es ubicua, es especialmente abundante en el hígado, en los riñones y en el hueso. La utilidad de la fosfatasa alcalina como marcador de la actividad ósea depende de la capacidad para distinguir cuantitativamente la actividad de la isoforma ósea de la de otros tejidos, lo que puede conseguirse con la aplicación de diferentes técnicas (Calvo *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1998).

En perro, aunque la FA aparece en gran variedad de tejidos, sólo las isoenzimas ósea (FAO), hepática (FAH) y la inducida por corticoesteroides (FAC) contribuyen a la actividad sérica de esta enzima (Syakalima *et al.*, 1997). Normalmente, la isoenzima FAC está presente en bajos niveles, pero pueden detectarse concentraciones elevadas tras la exposición a altas concentraciones de glucocorticoides tanto exógenos como endógenos (Hadley *et al.*, 1990). Las isoformas de FA óseas y hepáticas son producto del mismo gen pero difieren como resultado de la glucosilación postranslacional que es específica de cada órgano. La FA ósea es una proteína unida a membrana que es sintetizada por los osteoblastos y aparece en la superficie externa de los mismos, esta proteína funciona como una enzima jugando un importante papel tanto en la formación como en la calcificación del osteoide (Allen *et al.*, 2000a; Nishizawa *et al.*, 2005).

La fosfatasa alcalina ósea se eleva principalmente debido al crecimiento, en los procesos de curación de las fracturas óseas, en la enfermedad maligna ósea (primaria o metastásica) y en casos de hiperparatiroidismo primario o secundario (Watts, 1999).

Edad	FAT (U/L)	FAO (U/L)	FAH (U/L)	FAC (U/L)
Jóvenes	25,0-321,0	17,0-307,0	0,0-6,0	0,0-89,0
(de 6 días a 1 año)	(175,4±84,5)	(167,9±79,6)	(2,1±2,3)	(20,4±25,2)
Adultos	18,0-85,0	3,2-32,0	2,6-57,0	0,0-65,0
(de 1 a 7 años)	(35,9±18,1)	(13,5±6,3)	(19,2±15,8)	(3,9±11,8)
Geriátricos	18,0-231,0	3,2-6,2	8,4-158,0	0,0-140
(mayores a 7 años)	(74,2±64,3)	(19,1±13,8)	(38,8±44,9)	(19,9±31,8)

**Tabla 10:** Rangos de referencia y las medias ( $M \pm DE$ ) para la fosfatasa alcalina total (FAT) y sus isoenzimas en perros sanos jóvenes, adultos y geriátricos (Syakalima *et al.*, 1997)

Edad	FAT (U/L)	FAO (U/L)
0-1 año	59,2-141,2	47,5-107,3
1-2 años	37,1-139,3	10,3-43,9
3-7 años	12,0-73,2	0,9-24,5
Mayores de 7 años	2,8-188,4	11,2-26,0

**Tabla 11:** Rangos de referencia para la fosfatasa alcalina total (FAT) y la isoenzima ósea en perros de diferentes edades (Allen *et al.*, 1998)

La determinación de la FAO podría resultar de utilidad para el estudio del recambio óseo en perros; asimismo puede contribuir al diagnóstico y funcionar como marcador pronóstico en perros con desórdenes músculo-esqueléticos y metabólicos como hiperparatiroidismo, enfermedad renal, tumores óseos y osteomielitis (Allen *et al.*, 2000a). Se ha descrito que la medición de la actividad de la FAO supone un importante factor pronóstico en el caso de perros con osteosarcoma apendicular (Ehrhart *et al.*, 1998). Recientemente Komnenou *et al.* (2005) llevaron a cabo un estudio en el que concluyeron que la determinación de los niveles de fosfatasa alcalina puede resultar de utilidad en el pronóstico posquirúrgico de las fracturas óseas en pacientes caninos, puesto que existen diferencias estadísticamente significativas en la actividad de esta enzima dependiendo de la calidad de callo óseo, lo que nos demuestra otra utilidad potencial de este marcador.

Respecto al patrón de secreción de esta isoenzima a lo largo del día en el suero canino, Ladlow *et al.* (2002) encontraron que el pico de máxima actividad aparece a las 15:00 horas; esta elevación no coincide con la observada en el caso de la osteocalcina, ya que esta presentaba su pico máximo muy temprano por la mañana. Resultados similares fueron hallados en medicina humana por Nielsen *et al.* (1990) y por Parthemore *et al.* (1993). Ladlow *et al.* (2002) explicaron esta discrepancia de resultados postulando que estos dos marcadores pueden reflejar diferentes estados de maduración osteoblástica. Estos mismos investigadores también analizaron la actividad de la FAO a largo plazo (durante 12 semanas) y no encontraron variaciones significativas en las actividades de esta isoforma (Ladlow *et al.*, 2002).

#### **3.5.5.1.2. OSTEOCALCINA (OC)**

La osteocalcina representa del 15 al 20% de las proteínas de naturaleza no colágena del hueso, lo que la convierte en la más abundante de los tejidos mineralizados (Giannobile *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1998). Se trata de un péptido (46 a 50 aminoácidos) de 5,4 kD dependiente de la vitamina K que se sintetiza en los osteoblastos maduros, odontoblastos, condrocitos hipertróficos y megacariocitos (Giannobile *et al.*, 1995; Calvo *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1998).

Esta proteína extracelular contiene tres residuos de un aminoácido con capacidad de unión al calcio, el ácido gamma-carboxiglutámico (Gla). La presencia de este aminoácido, permite cambios conformacionales específicos que favorecen la unión de la osteocalcina a la

hidroxiapatita, con la consecuente acumulación de esta proteína en la matriz ósea (Giannobile *et al.*, 1995).

El paso de la osteocalcina al suero parece tener lugar durante la fase de mineralización del osteoide, debido a que en el momento en el que esta proteína es depositada en la matriz extracelular del hueso una pequeña cantidad de la misma entra en el torrente sanguíneo (Calvo *et al.*, 1996; Fink *et al.*, 2002).

Los niveles de osteocalcina aumentan durante periodos de rápido recambio óseo como la osteoporosis y durante la reparación de fracturas, también en periodos de crecimiento, en el hiperparatiroidismo primario y secundario, en el hipertiroidismo y en la insuficiencia renal. Disminuye en casos de hipotiroidismo y durante el tratamiento con corticoesteroides (Giannobile *et al.*, 1995; Watts, 1999).

Las concentraciones séricas de esta proteína presentan un ritmo circadiano, así en un estudio realizado en beagles se ha visto que los niveles más altos se alcanzan en torno a las 6:00 de la mañana y el nadir aproximadamente a las 14:00 horas (Liesegang *et al.*, 1999; Ladlow *et al.*, 2002). Este patrón de secreción coincide con el encontrado en el hombre (Gundberg *et al.*, 1985). Los glucocorticoides exógenos empleados en el hombre inhiben o incluso invierten el incremento nocturno en las concentraciones séricas de osteocalcina. El análisis de estos resultados sugieren que el cortisol, cuya secreción fisiológica varía a lo largo del día, podría influir en el ritmo circadiano de las concentraciones de este péptido (Liesegang *et al.*, 1999).

Edad	OC (ng/ml)
0-1 año	12,14-115,08
1-2 años	10,49-16,76
3-7 años	1,70-8,10
Mayores de 7 años	1,34-6,8

**Tabla 12:** Rangos de referencia para la osteocalcina en perros de diferentes edades (Allen *et al.*, 1998)

En cuanto a la fiabilidad de la OC como marcador óseo, se ha comprobado una correlación importante entre su concentración sérica y la concentración de otros marcadores de la formación ósea como la fosfatasa alcalina. Del mismo modo, una relación similar parece existir entre la concentración de OC y la DMO (Fanti *et al.*, 1993; Allen *et al.*, 1998). Por todo

ello, la OC es considerada como uno de los marcadores no invasivos más útiles para el estudio del metabolismo óseo (García-Carrasco *et al.*, 1988; Fink *et al.*, 2002).

### **3.5.5.1.3. PROPÉPTIDOS SÉRICOS DE PROCOLÁGENO TIPO I**

El colágeno tipo I, sintetizado por los osteoblastos, es la forma más abundante de colágeno en el organismo y es el tipo predominante tanto en el hueso como en los tendones. Al principio esta molécula es sintetizada en forma de un precursor mucho más largo, el procolágeno, que es secretado al espacio extracelular donde existen endopeptidasas específicas que rompen la molécula de procolágeno en lugares específicos para cada cadena, primero en el extremo aminoterminal y después en el extremo carboxiterminal (Allen *et al.*, 1998).

Estos propéptidos no se originan sólo en el hueso, sino también en otros tejidos que sintetizan colágeno tipo I como la piel, encía, válvulas cardíacas, dentina, córnea, fibrocartílago y tendones (Calvo *et al.*, 1996).

El propéptido carboxiterminal de procolágeno tipo I y el propéptido aminoterminal de procolágeno tipo I pueden detectarse mediante RIAs específicos. Las concentraciones de estos péptidos han sido empleadas como marcadores de la formación ósea en enfermedades metabólicas del hueso (Allen *et al.*, 1998).

En medicina humana se han observado aumentos de estas moléculas en la enfermedad de Paget y durante la menopausia. Disminuyen en los tratamientos con estrógenos, con bifosfanatos o calcitonina (Watts, 1999).

### **3.5.5.2. MARCADORES DE LA RESORCIÓN ÓSEA**

#### **3.5.5.2.1. MARCADORES SÉRICOS**

Los marcadores séricos de la resorción ósea reflejan o bien la actividad de los osteoclastos, por ejemplo la fosfatasa ácida resistente a tartrato (FART), o bien la degradación del colágeno tipo I, como es el caso del telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I, TCTI (Allen *et al.*, 2000b).

La importancia de la variación circadiana sobre las concentraciones de los marcadores de resorción ósea ha sido investigada por varios autores (Ladlow *et al.*, 2002; Liesegang *et al.*, 1999) y, recientemente, se ha demostrado que el momento de la comida tiene gran influencia

sobre la magnitud de la presencia de dichos marcadores en el suero a lo largo del día (Christgau, 2000). Por tanto, la realización de las tomas de sangre en ayunas puede contribuir a minimizar este tipo de variación (Christgau, 2000; Qvist *et al.*, 2004).

#### **3.5.5.2.1.1. FOSFATASA ÁCIDA RESISTENTE A TARTRATO (FART)**

La enzima FART ha sido identificada tanto en el borde rugoso de la membrana de los osteoclastos como en las secreciones del espacio de resorción, por lo que la medición de la actividad de la enzima FART sérica nos debería aportar un índice bastante exacto de la actividad de los osteoclastos y de la resorción ósea (Minkin, 1982; Price *et al.*, 1995).

El principal problema del empleo de este biomarcador reside en su determinación, puesto que pertenece al grupo de las fosfatasas ácidas que son enzimas hidrolasas no específicas que actúan sobre fosfomonoésteres a bajo pH. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en el organismo y alcanzan altas concentraciones en próstata, hígado, riñón, eritrocitos, plaquetas y osteoclastos (Allen *et al.*, 1989).

La FART también se ha denominado fosfatasa ácida tipo 5, ya que de las cinco bandas que se separan de la fosfatasa ácida en el gel de electroforesis constituye la más catódica. Posteriormente, esta banda pudo separarse en dos bandas adicionales, que recibieron el nombre de 5a y 5b. Finalmente se supo que la FART 5a se origina en los macrófagos y en las células dendríticas, siendo un marcador de la inflamación mientras que la FART 5b procede de los osteoclastos y funciona como marcador de la resorción ósea (Halleen, 2006).

Como ya hemos visto, el papel de los osteoclastos consiste en la degradación de la matriz ósea mineralizada, lo que implica tanto la disolución de la hidroxiapatita cristalina como la ruptura proteolítica de la matriz orgánica. La disolución de la fase mineral se consigue mediante la secreción de diversos ácidos; este proceso está mediado por la acción de bombas de protones vacuolares dependientes de ATP localizadas en el borde rugoso de los osteoclastos y en las vacuolas intracelulares. A su vez, se produce la secreción de enzimas proteolíticas que degradan la matriz ósea rica en colágeno. Los productos de degradación son transportados desde las lagunas de resorción (borde rugoso) hasta el dominio de secreción, donde se produce la exocitosis de las vesículas transcitósicas. El mecanismo implicado en la secreción de la FART 5b desde los osteoclastos hacia el plasma no se conoce bien a día de hoy; se considera que esta enzima es transportada por las vesículas junto a los productos de degradación ósea y probablemente sea secretada con ellos a través del dominio de secreción. Así, la FART, conocida desde hace muchos años, en este

momento está emergiendo como un biomarcador muy importante de la actividad osteoclástica y del recambio óseo (Igarashi *et al.*, 2002).

En medicina humana la elevación de la FART 5b es un marcador útil de la resorción ósea. De hecho, se ha comprobado en numerosos estudios clínicos que esta enzima aparece elevada en numerosas enfermedades que afectan al hueso como la osteoporosis posmenopáusia, metástasis óseas de cánceres de mama y próstata, mieloma múltiple y enfermedad de Paget (Halleen, 2006). También se ha visto que la actividad de la FART 5b se relaciona directamente con la extensión de las metástasis óseas y su elevación puede ocurrir incluso antes de que sean descubiertas por escintigrafía, además puede predecir el riesgo de fracturas en mujeres de edad avanzada (Gerdhem *et al.*, 2004; Chao *et al.*, 2005).

Actualmente se están intentando desarrollar inmunoensayos específicos destinados a la detección de la FART 5b, pero aún existe gran dificultad para la determinación de la isoenzima exclusiva de la actividad de los osteoclastos y su uso rutinario en medicina humana (Janckila *et al.*, 2004).

#### **3.5.5.2.1.2. TELOPÉPTIDO CARBOXITERMINAL DEL COLÁGENO TIPO I (TCTI)**

El colágeno tipo I constituye aproximadamente el 90% de la matriz orgánica del hueso y es el tipo de colágeno más abundante en el tejido óseo (Giannobile *et al.*, 1995). Los principales lugares de la molécula donde aparecen los puentes cruzados son los cortos telopéptidos no helicoidales presentes en cada uno de los extremos de la molécula de colágeno. Estos extremos reciben el nombre de telopéptido carboxiterminal de colágeno tipo I (TCTI) y telopéptido aminoterminal de colágeno tipo I (TATI).

La estructura del TCTI consiste en tres cadenas polipeptídicas unidas a través de enlaces cruzados trivalentes (piridinolina, deoxipiridinolina o pirrol). Estos enlaces cruzados aparecen unidos a las regiones helicoidales de las moléculas de colágeno vecinas (Eyre *et al.*, 1996). Después de que el colágeno tipo I se escinda, las concentraciones de TCTI se elevan en el suero (Charles *et al.*, 1994).

Las concentraciones séricas de TCTI en el perro parecen presentar un ritmo circadiano disminuyendo entre las 8:00 y las 16:00 (Liesegang *et al.*, 1999; Ladlow *et al.*, 2002).

En personas se ha comprobado que las concentraciones de TCTI en suero están correlacionadas con los ratios de resorción ósea en enfermedades como la osteomalacia, hiperparatiroidismo y osteoporosis, y con las concentraciones urinarias de piridinolina

(Eriksen *et al.*, 1993; Charles *et al.*, 1994; Valimaki *et al.*, 1994). Además, en el caso del perro se ha comprobado experimentalmente que la elevación de este marcador ocurre mucho antes que la aparición de los signos radiográficos de osteomielitis (Philipov *et al.*, 1995).

Edad	TCTI (ng/ml)
0-1 año	12,1-27,8
1-2 años	3,8-13,6
3-7 años	1,0-13,3
Mayores a 7 años	1,1-6,4

**Tabla 13:** Rangos de referencia para el TCTI en perros de diferentes edades  
(Allen *et al.*, 1998)

### 3.5.5.2.2. MARCADORES URINARIOS

Las pruebas comerciales para la determinación de los marcadores urinarios de la resorción ósea están basadas en la detección de los metabolitos del colágeno que son excretados a través de la orina. La rotura del colágeno tipo I, que está mediada por proteasas ácidas derivadas de los osteoclastos, conduce a la liberación de metabolitos libres y de péptidos unidos a metabolitos a partir de la molécula de colágeno tipo I (Hanson *et al.*, 1992).

#### 3.5.5.2.2.1. HIDROXIPROLINA

Es un aminoácido específico del colágeno, representando el 13% del contenido aminoacídico total de éste (Endres y Rude, 1994). Los péptidos que contienen hidroxiprolina son liberados a la orina por rotura del colágeno presente en los huesos y en otros tejidos. Desafortunadamente, la excreción urinaria de hidroxiprolina representa solamente en torno al 10% de la cantidad total liberada; además también deriva de la síntesis del propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I y de otros tipos de colágeno (Liesegang *et al.*, 1999).

Otro inconveniente reside en que los péptidos urinarios que contienen hidroxiprolina procedentes de la rotura del colágeno endógeno no son distinguibles del colágeno de la dieta, por ello si se van a recoger muestras de orina para la detección de hidroxiprolina será indispensable restringir la ingesta de gelatina y de otras comidas ricas en colágeno de 24 a 48 horas antes de la recogida de orina (Gasser *et al.*, 1980).



En un estudio realizado por Liesegang *et al.* en 1999, en el que trataban de investigar las variaciones circadianas de los principales marcadores del metabolismo óseo en el perro, encontraron que la hidroxiprolina comenzaba a aumentar justo después de la comida de forma paralela a como acontecía con el fósforo; es por esto que las variaciones que se producen a lo largo del día en las concentraciones de este marcador parecen provocadas más por la alimentación que por un ritmo de secreción circadiano.

#### **3.5.5.2.2. PIRIDINOLINA Y DEOXIPIRIDINOLINA**

Desde 1988 la piridinolina (PID) y deoxipiridinolina (DPD) han sido investigadas en medicina humana como marcadores para la detección de enfermedades óseas tales como la osteoporosis y el hiperparatiroidismo primario (Robins *et al.*, 1991).

La DPD se forma a partir de la condensación de dos residuos de hidroxilisina y de un residuo de lisina de cadenas  $\alpha$  adyacentes, y es liberada cuando las fibras de colágeno maduras son degradadas (Liesegang *et al.*, 1999). Se ha descrito la existencia de una buena correlación entre el recambio óseo y la excreción urinaria de esta molécula (Seibel *et al.*, 1992). La PID está formada por tres residuos de hidroxilisina y también presenta enlaces cruzados (Nishizawa *et al.*, 2005).

La deoxipiridinolina aparece casi de forma exclusiva en el hueso y además su medida no está influenciada por la degradación de colágeno recién generado ni por la dieta (Nishizawa *et al.*, 2005); mientras que la piridinolina está localizada en las fibras de colágeno óseas así como en el cartílago y en otros tejidos (por ejemplo, en tendones, en ligamentos y en vasos sanguíneos). Cuando la matriz de colágeno (fibras de colágeno maduras) se degrada, ambos tipos de compuestos con enlaces cruzados son liberados a la circulación y excretados, libres o unidos a proteínas, a través de la orina donde pueden ser medidos (Liesegang *et al.*, 1999).

Las concentraciones urinarias de PID y DPD en el perro difieren significativamente entre el día y la noche, lo que coincide con los hallazgos encontrados en humanos. Este hecho puede estar relacionado con una un ritmicidad intrínseca de la actividad del hueso. Así en perros beagle se ha encontrado que los niveles de estos dos marcadores disminuyen entre las 8:00 y las 14:00 horas, alcanzando el nadir en este punto y a partir de ahí comienzan de nuevo a aumentar (Liesegang *et al.*, 1999), del mismo modo Ladlow *et al.* (2002) también han descrito que el pico más alto aparece por la mañana mientras que el nadir lo hace por la tarde o tarde-noche.

Edad	PID	DPD
	(nM / mM Cr)	(nM / mM Cr)
0-1 año	288,6 (64,3)	43,2 (9,3)
1-2 años	59,6 (30,6)	5,7 (2,1)
2-3 años	50,1 (28,4)	4,2 (1,0)
3-7 años	69,9 (39,0)	4,2 (2,1)
Mayores a 7 años	52,5 (37,0)	4,1 (1,2)

**Tabla 14:** Concentraciones medias de piridinolina y deoxipiridinolina en orina en perros de diferentes edades. El valor entre paréntesis hace referencia a la desviación estándar (Allen *et al.*, 2000b)

### 3.5.5.2.3. N-TELOPÉPTIDO Y C-TELOPÉPTIDO

Durante la degradación del colágeno tipo I los fragmentos liberados de las regiones amino y carboxiterminal reciben el nombre respectivamente de N-telopéptido (NTx) y C-telopéptido (CTx). Ambas moléculas son pequeños péptidos procedentes de un dominio no helicoidal de la molécula de colágeno tipo I unidos a un *pyrinium* mediante un puente cruzado (o bien con una piridinolina o con una deoxipiridinolina). Una proporción de NTx y CTx es excretada sin sufrir alteraciones en la orina, mientras que la cantidad restante de estas moléculas es metabolizada por el hígado y los riñones, incluyendo los productos finales del metabolismo de NTx y CTx, aminoácidos y piridinolina o deoxipiridinolina libres o unidas a péptidos (Hanson *et al.* 1992; Allen *et al.*, 2000b).

Edad	NTx (nM mM Cr <sup>-1</sup> )	CTx (nM mM Cr <sup>-1</sup> )
0-1 año	4555,7 (1022,4)	2755,7 (886,8)
1-2 años	295,4 (65,2)	645,6 (156,7)
2-3 años	150,3 (104,8)	329,0 (109,6)
3-7 años	118,1 (34,4)	177,4 (85,2)
Mayores a 7 años	193,6 (89,5)	277,2 (123,2)

**Tabla 15:** Concentraciones medias de NTx y CTx en orina en perros de diferentes edades. Los valores entre paréntesis hacen referencia a la desviación estándar (Allen *et al.*, 2000b)

Actualmente, el NTx es considerado, en medicina humana, el marcador de resorción ósea más preciso en pacientes con alteraciones esqueléticas patológicas. De modo que en personas sometidas a terapia antiresortiva, debido a la presencia de osteoporosis o

osteólisis asociada a malignidades, la evaluación seriada de las concentraciones de NTx proporcionan un método sensible y objetivo para evaluar y monitorizar la respuesta clínica (Demers *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2002). Del mismo modo, en un estudio realizado por Lacoste *et al.* (2006) en perros que presentaban osteosarcoma apendicular y comparándolos con animales sanos de la misma edad encontraron que la excreción de NTx estaba significativamente elevada en los animales enfermos; además se produjo una disminución en las concentraciones de NTx urinarias después del tratamiento, lo que refleja la eliminación o minimización del foco de resorción patológica (Lacoste *et al.*, 2006).

Es preciso destacar que los niveles urinarios de los marcadores de recambio óseo deben ser corregidos por la excreción de creatinina con el fin de evaluar con mayor precisión la resorción ósea (Nishizawa *et al.*, 2004).

#### **3.5.5.2.3. VARIABILIDAD DE LOS MARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA A LARGO PLAZO**

En los epígrafes anteriores hemos ido mencionando las variaciones que presentan los marcadores de remodelación ósea a lo largo del día, pero hemos reservado este apartado para describir las posibles oscilaciones a largo plazo. En medicina humana se han detectado variaciones diurnas e incluso estacionales de muchos de los marcadores, incluidos los péptidos de colágeno, la fosfatasa alcalina ósea, la osteocalcina, piridinolina y deoxipiridinolina. La base de estos ritmos temporales todavía continúa sin ser esclarecida pero se piensa que pueden estar implicados factores como la actividad física, la ingesta de agua y de alimento, la función renal y cambios hormonales. En medicina veterinaria el único estudio que evaluó la variación a largo plazo de algunos de estos marcadores fue el publicado por Ladlow *et al.* en el 2002. Estos autores tomaron muestras de sangre durante 12 semanas en perros y no identificaron evidencias definitivas de variaciones en los siguientes marcadores: osteocalcina, TCTI, FAO, NTx y DPD. En este estudio, como era esperable, además se comprobó que la variabilidad intra-sujeto era mucho menor en aquellas pruebas basadas en sangre que en las que se realizaban en orina.

### **3.6. APOORTE DE MINERALES EN LA DIETA**

En la dieta, el término mineral designa a todos los elementos inorgánicos presentes en la misma que constituyen la mayor parte de la ceniza restante tras la combustión de la materia orgánica. Se considera que más de 18 elementos minerales son esenciales para los

mamíferos, de los cuales 7 son macrominerales y 11 microminerales. Por definición los requerimientos de macrominerales se miden en porcentaje y los de microminerales en partes por millón (ppm) (Lewis *et al.*, 1987).

Los macrominerales son el calcio, fósforo, sodio, magnesio, potasio, cloro y azufre; sus principales funciones son el mantenimiento del equilibrio ácido-base, de las presiones osmóticas, de los potenciales de membrana necesarios para gran variedad de funciones celulares, de la conducción nerviosa, de la contracción muscular y de la integridad estructural (Lewis *et al.*, 1987). Por otro lado, consideramos por lo menos 11 oligoelementos o minerales micronutrientes: hierro, cinc, cobre, yodo, selenio, manganeso, cobalto, molibdeno, flúor, boro y cromo. Los seis últimos, aunque no se dispone de evidencias, se supone que son necesarios en perros por su analogía con otras especies (Gross *et al.*, 2000). En cuanto a la función de los microminerales son componentes necesarios de las metaloenzimas, las cuales están implicadas en el control de un gran número de reacciones bioquímicas (Lewis *et al.*, 1987).

En dietética, los minerales deben considerarse como un grupo más que de forma individual, puesto que el exceso o deficiencia de alguno de ellos puede afectar significativamente a la capacidad del cuerpo para emplear otros minerales de la dieta (Case *et al.*, 2000).

A continuación realizaremos un breve resumen acerca del aporte dietético de sodio, cloro y potasio, ya que como veremos son los tres minerales monovalentes o electrolitos que entran a formar parte en la fórmula de la diferencia electrolítica de la dieta (DED). Seguidamente, incluiremos una pequeña revisión sobre el calcio, el fósforo y el magnesio, dada su gran importancia en el metabolismo óseo.

### **3.6.1. SODIO Y CLORO**

La gran importancia de estos elementos reside, principalmente, en que participan en el mantenimiento de la presión osmótica, en la regulación del equilibrio ácido-base, en la transmisión de impulsos nerviosos y en la contracción muscular a través de la acción de la Na-K-ATPasa (bomba de sodio) (Gross *et al.*, 2000).

El sodio y el cloro también controlan la entrada de nutrientes en las células:

La absorción de azúcares y aminoácidos requiere la presencia de iones de sodio en la luz del intestino delgado, además las concentraciones insuficientes de dicho electrolito reducen la utilización de las proteínas digeridas y de la energía. Por otro lado, también influye sobre la

absorción y la movilización del calcio y puede afectar a las concentraciones plasmáticas de numerosas vitaminas hidrosolubles (riboflavina, tiamina y ácido ascórbico) cuya absorción está acoplada a este mineral (Gross *et al.*, 2000).

Por su lado, el cloro es necesario para la formación de ácido clorhídrico en el estómago, que inicia la digestión a este nivel, y es necesario para la activación de varias enzimas gástricas (Case *et al.*, 2000).

Ambos minerales se absorben con rapidez, el cloro en la región superior del intestino delgado mientras que el 80% del sodio lo hace en el colon (Hill *et al.*, 2001), y se excretan en su mayor parte en la orina y en menor cantidad en las heces y en el sudor. Algunas especies pierden grandes cantidades de sal a través del sudor, de la secreción de leche, de los vómitos y de la diarrea. Cuando la ingesta de sodio es insuficiente, el organismo activa mecanismos para conservarlo reduciendo al mínimo la excreción urinaria. La regulación del metabolismo del cloro está estrechamente relacionada con el sodio, así, la excreción urinaria excesiva de sodio se acompaña por excreción urinaria de cloro (Gross *et al.*, 2000).

Existen dos hormonas que mantienen una proporción constante de sodio en el LEC:

- La aldosterona incrementa la reabsorción de sodio, puesto que eleva el número y la actividad de los conductos de sodio abiertos en las membranas lumbales de las células principales en los conductos de recolección (DiBartola, 2002a).
- La hormona antidiurética (ADH) responde a los cambios en la presión osmótica en el LEC (Gross *et al.*, 2000), promoviendo una mayor retención de agua libre en relación con aumentos en las concentraciones plasmáticas de sodio.

Los requerimientos de sodio son más elevados durante la reproducción, lactación, etapas de crecimiento rápido y de estrés por calor; además un aumento de los niveles de potasio dietéticos hacen que se incrementen las necesidades de dicho electrolito (Gross *et al.*, 2000).

Respecto a los alimentos comerciales para mascotas, el contenido típico de sodio excede entre 4 y 15 veces el nivel mínimo recomendado. Es una práctica general incluir un 1% de cloruro sódico en los piensos caninos de mantenimiento, esta cantidad se considera dentro del límite apropiado pero los requerimientos mínimos son excedidos en gran medida (NRC, 2006). La AAFCO recomienda aportar un 0,3% de sodio para perros durante el crecimiento y la reproducción y un 0,06% para el mantenimiento del adulto (AAFCO, 1998). No se han llevado a cabo estudios para definir el requerimiento de cloro para perros o gatos, pero la

recomendación es 1,5 veces más elevada que la de sodio, por lo tanto, será de un 0,45% para animales en crecimiento y reproductores y un 0,09% para el mantenimiento del animal adulto (AAFCO, 1998).

Puesto que en algunos casos se ha descrito que la ingestión excesiva de sodio en perros puede estar relacionada con problemas de hipertensión, parece prudente establecer un nivel máximo de sodio para reducir la posibilidad de que se produzcan trastornos de este tipo (Burger, 1989).

No se han realizado estudios hasta el momento sobre la ingestión excesiva de cloro en perros sanos (NRC, 2006).

Como alimentos ricos en sodio y en cloro podemos destacar el pescado, los huevos, el suero desecado y los derivados de soja. Los suplementos de sodio, cloruro o ambos que se añaden a los alimentos para animales de compañía incluyen sal, fosfatos de sodio, cloruro de calcio, cloruro de colina, cloruro de potasio y acetato de sodio (Gross *et al.*, 2000).

### 3.6.2. POTASIO

Es el tercer mineral más abundante del organismo y se encuentra en concentraciones elevadas en el líquido intracelular (LIC). Participa en el mantenimiento del equilibrio ácido-básico y del balance osmótico, es imprescindible en la transmisión de impulsos nerviosos y en la contractibilidad muscular; además actúa como cofactor en numerosos sistemas enzimáticos (Gross *et al.*, 2000).

El potasio es absorbido principalmente mediante un proceso de difusión simple desde la región superior del intestino delgado, aunque también lo hace en parte en la región inferior de este y en el intestino grueso. La disponibilidad del potasio es elevada en la mayoría de los comestibles (95% o superior), pero los alimentos para perros deben contener una cantidad adecuada de este elemento debido a que a diferencia de otros minerales no se almacena, lo que hace que sea preciso un aporte diario con la dieta. La ingesta elevada de potasio no causa hipercalemia sostenida a menos que haya un deterioro de su excreción renal (Gross *et al.*, 2000).

El requerimiento orgánico de potasio aumenta con el incremento de proteínas, con la densidad energética, con el contenido de cloruro en la dieta y con otros factores como el estrés (calor, ejercicio) y la producción de leche. La AAFCO recomienda un aporte del 0,6% de potasio para perros en todas las etapas de su vida (AAFCO, 1998), la concentración de

este mineral en los piensos comerciales caninos suele variar entre un 0,7 y un 0,85% (NRC, 2006).

Como fuentes ricas en potasio están la harina de soja, los granos sin refinar, la fibra (soja molida, cáscara de girasol, salvado de arroz y de trigo) y la levadura. A los alimentos para animales de compañía se les suele añadir citrato, cloruro y sulfato de potasio como fuente de este elemento (Gross *et al.*, 2000).

MINERAL	FUNCIÓN	DEFICIENCIA	EXCESO
<b>SODIO Y CLORURO</b>	Presión osmótica; balance ácido-base; transmisión de impulsos nerviosos; captación de nutrientes; excreción de desechos; metabolismo del agua.	Incapacidad para mantener el balance de agua; retraso en el crecimiento; anorexia; fatiga; agotamiento; caída de pelo; agalactia; pica.	Ocurre sólo cuando el agua de buena calidad es insuficiente. Sed, prurito, constipación, convulsiones y muerte. Su aumento crónico puede dar lugar a hipertensión y aumento de enfermedades renales y cardíacas.
<b>POTASIO</b>	Contracción muscular; transmisión de impulsos nerviosos; balance ácido-base; balance osmótico; cofactor enzimático (transferencia de energía).	Anorexia; Retraso del crecimiento; letargia; problemas de locomoción; parálisis ascendente; hipopotasemia; lesiones cardíacas y renales; emaciación.	Raro. Paresia, cardiotoxicidad y muerte.

**Tabla 16:** Funciones del sodio, cloruro, potasio y efectos de sus deficiencias y excesos (Lewis *et al.*, 1987; Gross *et al.*, 2000)

### 3.6.3. CALCIO Y FÓSFORO

Debido a su estrecha asociación metabólica abordaremos de forma conjunta las necesidades de estos dos minerales.

El calcio es un catión divalente con dos funciones principales en el organismo: por un lado mantiene la estructura ósea y de los dientes y, por otro, presenta un importante papel como mensajero celular. El organismo regula cuidadosamente las concentraciones de calcio y en aquellos momentos en los que la calcemia disminuye, se produce la liberación de PTH al torrente sanguíneo provocando un incremento de la liberación de este mineral desde los

huesos y aumentando su reabsorción a nivel renal. Por otro lado la PTH también eleva la cantidad de vitamina D activa, la cual provoca un aumento de la absorción de calcio a nivel de la mucosa gastrointestinal (Nap y Hazewinkel, 1994).

El metabolismo y las funciones del fósforo, como ya hemos mencionado, están estrechamente relacionados con las del calcio. El fósforo desempeña un papel estructural a nivel óseo y, además, es un componente de los ácidos nucleicos, del ATP y de los fosfolípidos (Gross *et al.*, 2000).

Las cantidades de calcio y fósforo en la dieta deben ser apropiadas y equilibradas con el fin de proporcionar un crecimiento óseo adecuado en animales jóvenes y el mantenimiento de las funciones metabólicas a través de los diversos estadios de la vida (Steiff y Bauer, 2001). Por este motivo, además de las cantidades absolutas de estos minerales, también resulta de gran importancia el mantenimiento del ratio calcio/fósforo de la ración. De hecho, el desequilibrio de las proporciones de estos dos minerales es la primera causa de anormalidades esqueléticas (Baker y Czarnecki-Maulden, 1991). En el caso del perro el mantenimiento de un ratio de 1,2:1 a 1,4:1 es considerado el óptimo para conseguir una utilización máxima de estos minerales. Asimismo el empleo de un ratio calcio/fósforo adecuado minimiza las necesidades de vitamina D (NRC, 2006).

Las recomendaciones de la AAFCO (1998) para el calcio son de 0,6% sobre materia seca en el caso de dietas para el mantenimiento del adulto y de 1% en casos de crecimiento y reproducción; mientras que para fósforo son actualmente de 0,5 y 0,8% sobre materia seca respectivamente.

El fósforo está presente en muchos alimentos lo que hace que su deficiencia sea rara (Hazewinkel, 1994). Los disturbios más frecuentes en relación con estos dos minerales son los siguientes:

- La deficiencia crónica de calcio es la alteración más frecuente de dicho elemento y está asociada con hiperplasia paratiroidea progresiva (hiperparatiroidismo secundario nutricional). Las dietas caseras preparadas a base de carne, pan y patatas provocan con frecuencia deficiencias de calcio, puesto que la carne es rica en fósforo pero baja en calcio. Este desequilibrio puede conducir al desarrollo de un metabolismo óseo anormal y a problemas esqueléticos graves (Hazewinkel, 1994; Nap y Hazewinkel, 1994). Los signos clínicos incluyen dolor esquelético, negativa a caminar, cojeras y



en casos graves deformidades esqueléticas con la aparición frecuente de fracturas en tallo verde (Nap y Hazewinkel, 1994).

- El exceso de calcio también puede ser la causa de alteraciones que aparecen sobre todo cuando los propietarios suplementan en calcio dietas cuyo contenido en este mineral ya es suficiente o cuando los perros son alimentados con dietas caseras poco equilibradas. Los signos clínicos de estos desequilibrios se manifiestan de forma más grave en perros en crecimiento e incluyen nefrosis, cojeras y engrosamiento de las uniones costocondrales (Steiff y Bauer, 2001). Además, el exceso de calcio dietético puede influir negativamente en la absorción intestinal de fósforo, magnesio y posiblemente de zinc, y por tanto puede dar lugar a patologías relacionadas con las deficiencias de estos minerales (Nap y Hazewinkel, 1994).
- Una elevada ingestión de fósforo en la dieta puede originar la aparición de hiperfosfatemia con una disminución concomitante de la absorción de calcio. Como resultado de la ingesta excesiva de fósforo en relación al calcio suelen aparecer signos de deficiencia de calcio, dando lugar a la aparición de hiperparatiroidismo secundario nutricional (Nap y Hazewinkel, 1994).

Llegados a este punto es necesario hacer hincapié en los requerimientos de calcio y fósforo necesarios en perros de razas grandes. Los resultados de un estudio realizado por Schoenmakers *et al.* (2000) mostraron que una excesiva ingesta de calcio por parte de perros jóvenes de razas grandes causaba trastornos de la mineralización esquelética y de la calcificación endocondral, dependiendo de las cantidades absolutas de calcio y fósforo ingeridas. Así, una alta cantidad de calcio en la ración sin aumento proporcional de fósforo provocaba signos radiológicos e histológicos de raquitismo, mientras que altas cantidades de ambos minerales causaba signos de osteocondrosis. Con anterioridad Hazewinkel *et al.* (1987) realizaron un estudio con cachorros de razas grandes alimentados con dietas con bajo contenido en calcio donde comprobaron la aparición de anomalías esqueléticas severas. Sin embargo, Nap *et al.* en 1993 no apreciaron alteraciones en el desarrollo esquelético en cachorros de raza pequeña alimentados con contenidos de calcio y fósforo comparables a la de los dos trabajos descritos con anterioridad. Estos resultados contradictorios hacen pensar en que los márgenes de seguridad de la ingesta de calcio y fósforo en perros de razas grandes son relativamente estrechos y, por esta razón, la ingesta de estos dos minerales debe ser monitorizada estrechamente para evitar la aparición de alteraciones esqueléticas (Schoenmakers *et al.*, 2000).

Finalmente mencionar que además de las cantidades absolutas y de las proporciones de calcio y fósforo, también es necesario tener en cuenta otros componentes de la dieta, puesto que por ejemplo: las dietas ricas en fitatos y pobres en vitamina D presentan una influencia negativa sobre la absorción de calcio, mientras que la suplementación en vitamina D en dietas pobres en calcio provoca la aparición de fracturas, cojeras y pérdida de densidad esquelética (NRC, 2006).

### 3.6.4. MAGNESIO

Como ya hemos visto en el apartado correspondiente, el magnesio, junto con el calcio, es el principal catión divalente presente en los sistemas biológicos, presentando una participación más amplia que este en los procesos metabólicos (Hansen, 2002).

Desde hace casi un siglo se sabe que el magnesio es un elemento imprescindible en la dieta canina. No existe un consenso entre los trabajos publicados respecto a los requerimientos cuantitativos de este mineral, pero se considera que si se administra una ración equilibrada la concentración dietética mínima que requieren los perros adultos es de 80 ppm y los perros en crecimiento de 120 ppm (Bunce *et al.*, 1962a y 1962b). Las recomendaciones del NRC sobre el contenido de magnesio en la dieta de los perros y gatos en crecimiento son de 400 ppm, cantidad que coincide con las recomendaciones de la AAFCO para el crecimiento, reproducción y mantenimiento del adulto. La concentración máxima recomendada de este mineral es de 3000 ppm (Hansen, 2002).

Los signos provocados por una deficiencia de magnesio en cachorros incluyen anorexia, vómitos, disminución de la ganancia de peso, irritabilidad, ataxia, ataques convulsivos y alteraciones en el transporte del sodio y potasio. En estos animales destaca analíticamente la disminución de las concentraciones séricas de calcio y magnesio, así como un aumento del fósforo inorgánico (NRC, 2006), lo que puede estar relacionado con la incapacidad de la glándula paratiroides de secretar PTH en casos de hipomagnesemia (Miki *et al.*, 1997). En perros adultos se ha detectado la aparición de pérdida de peso y disminución de las concentraciones séricas de este mineral, pero no correlacionadas con cambios en las concentraciones de calcio y fósforo. La severidad del síndrome provocado por la deficiencia de magnesio se incrementa por la elevación de los niveles dietéticos de calcio y fósforo (NRC, 2006).

### 3.7. DIFERENCIA ELECTROLÍTICA DE LA DIETA Y SALES IÓNICAS

En nutrición animal el término “electrolitos” se emplea principalmente para referirse al sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ) y cloro ( $\text{Cl}^-$ ). Los electrolitos son elementos con la capacidad de disolverse y disociarse en iones positivos y negativos en un medio adecuado (Gezen *et al.*, 2005). Estos minerales monovalentes son esenciales para la síntesis de proteínas tisulares, el mantenimiento de la homeostasis intracelular y extracelular, el potencial eléctrico de las membranas, las reacciones enzimáticas, el mantenimiento de la presión osmótica y del balance ácido-base (Borges *et al.*, 2002; Borges *et al.*, 2003). Los electrolitos son aportados tanto por ingredientes naturales como por sales electrolíticas (Monghaddam *et al.*, 2005).

Debido a los pocos estudios con los que contamos, en la formulación de las dietas caninas es una práctica común incluir todos los minerales que son necesarios para otros mamíferos, aunque los requerimientos cuantitativos de los mismos no se hayan establecido experimentalmente. Por lo tanto, las concentraciones de los minerales empleadas en las dietas caninas están basadas generalmente en estimaciones extrapoladas de las necesidades de otras especies. Dentro de los minerales, en particular, los requerimientos de sodio, potasio y cloro han recibido poca atención en los estudios de nutrición canina (NRC, 2006). El potasio contenido en la dieta rara vez es deficiente y los requerimientos de sodio y de cloro se satisfacen fácilmente mediante la adición de sal ( $\text{NaCl}$ ). Además, los trabajos referentes a los electrolitos han estado orientados fundamentalmente a la determinación de los requerimientos dietéticos mínimos y del margen de seguridad, prestando poca o ninguna consideración a las interacciones entre aniones y cationes (Kealy *et al.*, 1993).

Teniendo en cuenta esto, a lo largo de esta revisión vamos a centrarnos en otras especies de monogástricos en las que sí se ha estudiado con detenimiento la importancia del aporte de electrolitos en la dieta y las combinaciones de los mismos. También nos apoyaremos en datos tomados de poligástricos (ganado vacuno y ovino) por tratarse de especies en las que se han llevado a cabo investigaciones más minuciosas en lo referente a este tema.

Ender *et al.* descubrieron en el año 1971 que el uso de ácidos orgánicos en la ración de las vacas secas reducía significativamente el número de animales que desarrollaba hipocalcemia postparto, abriendo el camino a posteriores investigaciones en los beneficios que presenta la modificación de los aniones de la ración.

Posteriormente, el término “diferencia electrolítica de la dieta” (DED) lo estableció Mongin en 1980 para el caso de las aves, este autor propuso un concepto que relaciona la diferencia

entre aniones y cationes de la dieta con el balance ácido-básico y con otras manifestaciones fisiológicas. Mongin describió el concepto fundamental en la siguiente relación entre iones:

$$DED = (Na^+ + K^+ + Ca^{2+} + Mg^{2+}) - (Cl^- + SO_4^{2-} + H_2PO_4^- + HPO_4^{2-})$$

Las concentraciones estaban expresadas en miliequivalentes por 100 g de dieta. Esta relación resultó ser muy compleja, por lo que el autor la simplificó posteriormente a una ecuación más sencilla (Mongin, 1981):

$$DED = (Na^+ + K^+ - Cl^-)$$

La ecuación anterior define la diferencia electrolítica de la dieta (DED), término que vamos a emplear constantemente a lo largo de esta revisión.

Las dietas formuladas para aportar 250 mEq/kg MS de DED se han recomendado para obtener un crecimiento óptimo en pollos (Mongin, 1981) y cerdos (Austic y Calvert, 1981), mientras que las vacas de leche necesitan de 200 a 375 mEq/kg de MS de DED para lograr una ingesta y producción de leche máximas (Tucker *et al.*, 1988; West *et al.*, 1991). Además de estos ejemplos, las diferentes ecuaciones que definen la relación entre los electrolitos de la dieta han sido aplicadas de forma exitosa en muchos tipos de dietas y buscando múltiples fines, por ejemplo, la combinación electrolítica más adecuada para mejorar la calidad de la cáscara de los huevos (Gezen *et al.*, 2005; Senkoğlu *et al.*, 2005); aumentar el rendimiento cárnico en broilers (Johnson y Karunajeewa, 1985; Borges *et al.*, 2002; Borges *et al.*, 2003; de Oliveira *et al.*, 2003; Moghaddam *et al.*, 2005); estudiar su posible relación con anormalidades óseas y cartilaginosas en aves (Halley *et al.*, 1987); mejorar el crecimiento y la digestibilidad en ganado porcino (Golz y Grenshaw, 1990; Haydon *et al.*, 1990; Dersjant-Li *et al.*, 2001a; Dersjant-Li *et al.*, 2001b); valorar la influencia sobre el crecimiento óseo en esta misma especie (Budde y Crenshaw, 2003); prevenir la aparición de hipocalcemias en vacas de producción lechera (Dishington, 1975; Block, 1984); medir los índices de formación y resorción ósea en corderos (Abu Damir *et al.*, 1991) y ayudar a la prevención de displasia y luxación de cadera en perros (Kealy *et al.*, 1993), entre otros muchos ejemplos.

La manera de modificar de forma única (sin alterar otros componentes de la dieta) esta ecuación pasa por añadir sales aniónicas o catiónicas en la elaboración de la dieta. Estas sustancias se definen como sales ricas en iones fijos, no metabolizables a formas más sencillas, cargadas negativamente (sobre todo  $Cl^-$  y  $S^{2-}$ ) o de forma positiva ( $Na^+$  y  $K^+$ ) (Gant

*et al.*, 1998). La diferencia cuantitativa entre los iones de la dieta nos permite calcular el poder ácido o básico de la ración.

A lo largo de nuestra revisión hemos recogido diferentes denominaciones para esta diferencia:

- Alkali-alcalinidad: fue el utilizado por los primeros investigadores en este tema (Dishington, 1975).
- Balance catiónico-aniónico por Block (1984) y Goff y Horst (1997).
- Balance electrolítico de la dieta o diferencia electrolítica de la dieta: más empleado en la nutrición de pollos y cerdos (Saveur y Mongin, 1978; Yen *et al.*, 1981).
- Diferencia de iones fijos según Fredeen *et al.* (1988a)
- Diferencia catiónica-aniónica de la dieta: es el término más utilizado actualidad en nutrición de rumiantes (Pehrson *et al.*, 1999; Schonewille *et al.*, 1999).

Las variaciones observadas en la absorción intestinal de los diferentes iones hacen que todavía exista cierta incertidumbre a la hora de elegir cuáles son los iones que deben incluirse en el cálculo de la diferencia catiónica-aniónica de la dieta. Existe unanimidad en la introducción del potasio, sodio y cloro, ya que los tres presentan una biodisponibilidad similar y son los que mayoritariamente van a determinar el equilibrio ácido-base del medio plasmático. En lo referente a la inclusión del azufre en el cálculo, hay dos versiones encontradas en el caso del ganado vacuno: así, Horst *et al.* (1997) afirman que no existen evidencias ciertas de que el azufre elemental acidifique la sangre, ya que es absorbido con menor eficacia que el cloro (60% frente a >90%) y, además, en los alimentos este elemento suele encontrarse en una forma reducida, como un componente de las proteínas, lo que también contribuye a disminuir su poder acidogénico; otro trabajo que justifica esta teoría es el de Goff *et al.* (2004) los cuales probaron que el cloro presenta 1,6 veces mayor actividad acidificante que el azufre. En una posición opuesta, se encuentran las observaciones de Tucker *et al.* (1992), quienes consideran que el azufre es un agente acidificante tan eficaz como el cloro.

En el caso de monogástricos (cerdos, pollos y perro), la fórmula que se ha empleado hasta la fecha ha sido la que contiene únicamente sodio, potasio y cloro, probablemente debido a que en general el azufre no es necesario en la dieta si el alimento cumple los requerimientos de aminoácidos azufrados para animales monogástricos (Gross *et al.*, 2000). Además, ni la

AAFCO ni el NRC registran un requerimiento de azufre para perros (AAFCO, 1998; NRC, 2006).

A partir de este punto, para evitar confusiones emplearemos el término diferencia electrolítica de la dieta (DED) para hacer referencia a la ecuación que incluye únicamente al sodio, potasio y cloro, cuyo uso está más extendido en nutrición de monogástricos; y utilizaremos diferencia catión anión de la dieta (DCAD) para referirnos a la fórmula empleada por Tucker *et al.* en 1992, que por las razones anteriormente mencionadas se ha venido usando prácticamente de forma exclusiva en rumiantes.

### 3.7.1. TIPOS DE SALES: ANIÓNICAS Y CATIÓNICAS

En este apartado intentaremos resumir las características de los tipos de sales que se han empleado de forma más frecuente para inducir variaciones en la diferencia electrolítica de la dieta.

Para empezar es necesario mencionar que las propiedades acidificantes de las distintas sales dependen de la absorción preferencial de los diversos iones. De este modo, el cloruro sódico está considerado un compuesto neutro ya que el cloro y el sodio son absorbidos con la misma eficacia y cada molécula de sodio se acompaña de una de cloro. La teoría de “iones fuertes” propuesta por Stewart (1983) sugiere que sodio y potasio tienen la misma capacidad de alcalinizar la sangre ya que se absorben casi en su totalidad. El calcio y el magnesio, elementos que se ignoran en la mencionada ecuación general, son también cationes fuertes que son capaces de aumentar el pH sanguíneo; sin embargo, su absorción es más reducida que la del sodio y potasio (38 y 28% respectivamente), lo que hace que tengan menor poder como agentes alcalinizantes (Mongin, 1981; Horst *et al.*, 1997).

Sales aniónicas	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	NH <sub>4</sub> Cl	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Peso molecular (g)	203,3	246,5	147	172,2	53,5	132,1
Peso equivalente (g)	101,7	123,3	73,5	86,1	53,5	66,1
Magnesio (%)	11,96	9,86				
Calcio (%)			27,26	23,28		
Nitrógeno no proteico (%)					26,2	21,2
Cloro (%)	34,87		48,22		66,26	
Azufre (%)		13,01		18,62		24,26

**Tabla 17:** Composición química de las principales sales aniónicas (Oetzel *et al.*, 1991)

En la tabla nº 17 podemos observar las principales características de las sales aniónicas que se han empleado con más frecuencia en ganado vacuno. En cerdos y pollos las más utilizadas han sido: el cloruro amónico y cloruro cálcico (Johnson y Karunajeewa, 1985; Halley *et al.*, 1987; Dersjant-Li *et al.*, 2001b; Borges *et al.*, 2002; Dersjant-Li *et al.*, 2002; Judice *et al.*, 2002; Budde y Crenshaw, 2003; Borges *et al.*, 2003; Senkoylu *et al.*, 2005; Gezen *et al.*, 2005). En perro el único estudio existente añade cloruro cálcico, aunque con su empleo en otras especies se ha demostrado que puede resultar muy irritante disminuyendo significativamente la ingesta de alimento (Kealy *et al.*, 1993).

Sales catiónicas	NaHCO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	KHCO <sub>3</sub>	Citrato potásico C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub> K	Citrato sódico C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub> Na
Peso molecular	84	138,2	100,1	230,16	220,05
Peso equivalente	42	69,1	50,05	230,16	220,05
Potasio (%)		56,58	39,05	16,99	
Sodio (%)	27,37				10,56

**Tabla 18:** Resumen de las sales catiónicas empleadas más frecuentemente en la nutrición de aves y porcino y de sus principales características. El citrato potásico y el citrato sódico solamente fueron empleadas por Budde y Crenshaw (2003), coincidiendo los restantes autores en las 3 primeras

En cuanto a las sales catiónicas las que más se han empleado en porcino y en avicultura (tabla 18) son el carbonato potásico (Johnson y Karunajeewa, 1985; Senkoylu *et al.*, 2005), el bicarbonato potásico (Halley *et al.*, 1987; Patience y Chaplin, 1997; Borges *et al.*, 2002; Borges *et al.*, 2003; Moghaddam *et al.*, 2005;) y el bicarbonato sódico (Haydon *et al.*, 1990; Patience y Chaplin, 1997; Dersjant-Li *et al.*, 2001a; Borges *et al.*, 2002; Borges *et al.*, 2003; de Oliveira *et al.*, 2003; DeRouchey *et al.*, 2003; Gezen *et al.*, 2005; Moghaddam *et al.*, 2005; Senkoylu *et al.*, 2005). En el perro Kealy *et al.* en el año 1993 utilizaron en su estudio una combinación de bicarbonato potásico y sódico.

### 3.7.2. TIEMPOS DE ADMINISTRACIÓN DE LAS SALES

En la bibliografía consulta existe mucha variabilidad en cuanto al número de días que se utilizaron las dietas modificadas dependiendo, sobre todo, de la especie a estudiar y de la finalidad del ensayo. A continuación exponemos un pequeño resumen de la duración temporal de los principales trabajos.

La mayor parte de los estudios realizados en aves han estado orientados a evaluar la repercusión que presenta la DED en el crecimiento y la ingesta, sobre el equilibrio ácido-base y sobre la aparición de enfermedades del crecimiento como la discondroplasia tibial. Los tiempos que han empleado la inmensa mayoría de los autores han sido menores a 28 días (Borges *et al.*, 2002; Borges *et al.*, 2003; Gezen *et al.*, 2005; Moghaddan *et al.*, 2005).

En el caso de los trabajos realizados en porcino, los principales objetivos han sido estudiar los efectos de la DED sobre el crecimiento, las concentraciones plasmáticas de iones, el equilibrio ácido-base y en algún caso las repercusiones sobre el metabolismo óseo. El estudio de mayor duración ha sido el de Dersjant-Li *et al.* (2001a) que llegó a los 35 días; la media de la mayoría de los trabajos está situada entre 21 y 23 días (Patience *et al.*, 1987; Golz y Crenshaw, 1990; Haydon *et al.*, 1990; Golz y Crenshaw, 1991; Patience y Chaplin, 1997). Hay que destacar que en el trabajo llevado a cabo por Budde y Crenshaw (2003) se realizaron varios experimentos que tuvieron duraciones de 13, 15 y 17 días, en los que se estudiaron los efectos de las dietas sobre las reservas minerales óseas.

### 3.7.3. EFECTOS EN EL EQUILIBRIO ÁCIDO-BÁSICO SANGUÍNEO

La importancia de la composición mineral de la dieta en el metabolismo ácido-base ha sido estudiada en medicina humana durante los últimos cuarenta años y, más recientemente, también se ha empezado a tratar este tema en veterinaria, sobre todo, en el caso del ganado vacuno, del porcino y en avicultura. En perros, sin embargo, todavía existen pocos conocimientos en lo que respecta a este tema. La comprensión del impacto de las cargas ácidas o alcalinas del alimento en la química sanguínea y en la formación de orina proporcionaría una información muy útil y necesaria para el ajuste de las dietas tanto fisiológicas como de prescripción (Gevaert *et al.*, 1991).

La influencia sobre el equilibrio ácido-básico de la diferencia electrolítica de la dieta se fundamenta en la teoría de “iones fuertes” publicada por Stewart en 1983. Los dos postulados básicos en los que se asienta esta teoría son:

- El número de moles de partículas con carga positiva (cationes) en cualquier solución debe ser igual al número de moles de partículas con carga negativa (aniones) presentes en la misma:  $n^{\circ} \text{ cationes} = n^{\circ} \text{ aniones}$ .
- El producto de la concentración de iones de hidrógeno e iones hidroxilo debe ser igual a la constante de disociación del agua, aproximadamente  $1 \times 10^{-14}$ .



Además ambas ecuaciones deben cumplirse al mismo tiempo.

Debido a que el pH de una solución es igual al logaritmo negativo de la concentración de protones, el empleo de esta teoría implica que el pH de dicha solución es dependiente de la diferencia entre el número de cationes y aniones presentes en la misma. Si se añaden partículas con carga positiva a una solución, como es el plasma, el número de protones tendrá que disminuir y el número de iones hidroxilo aumentar para mantener la electroneutralidad de la solución (por lo tanto el plasma se volvería alcalino). En el caso contrario, la adición de aniones provoca un incremento en el número de iones de hidrógeno y descenso en los iones hidroxilo para mantener la electroneutralidad y por tanto disminuye el pH (el plasma se volvería ácido).

De esto se deduce que la diferencia en el número de equivalentes de aniones y de cationes, disponibles en la dieta, determina el estado ácido-base del individuo. Los animales se encontrarían en un estado de acidosis si predomina la absorción de aniones, mientras que pasarían a una situación de alcalosis en el caso de que fuese mayor la absorción de cationes (Horst *et al.*, 1997).

Aunque la mayoría de los estudios existentes para valorar la influencia de la DED sobre el equilibrio ácido-base se han realizado en el ganado vacuno, nosotros vamos a centrar esta revisión en los resultados obtenidos en cerdos y pollos, puesto que la similitud fisiológica del perro con el cerdo es superior a la que presenta con los rumiantes, y porque los fines con los que se ha estudiado este parámetro en aves, influencia sobre el crecimiento y prevención de enfermedades esqueléticas, estarían más relacionados con la finalidad que se podría llegar a buscar en perros; aún así haremos alguna mención a rumiantes para detalles que aún no han sido estudiados en las especies a las que nos hemos referido anteriormente.

En porcino se han realizado varios estudios con el fin de medir las repercusiones de la DED en el equilibrio ácido-base orgánico, en los que se ha corroborado que la disminución de diferencia electrolítica de la dieta cursa con una disminución del pH en sangre arterial, del  $\text{HCO}_3^-$  y del BE, indicando que la carga ácida excede ligeramente la capacidad de compensación mecanismos renales y respiratorios (Budde y Crenshaw, 2003; DeRouchey *et al.*, 2003). Por otro lado, en esta misma especie también se han llevado a cabo investigaciones aplicando DED altas en lugar de bajas, comprobando que el pH sanguíneo, el  $\text{HCO}_3^-$  y el EB aumentan linealmente al aumentar la DED (Patience *et al.*, 1986; Patience *et al.*, 1987; Haydon *et al.*, 1990, DeRouchey *et al.*, 2003). En todos los estudios mencionados

hasta ahora, es necesario destacar que aún existiendo una variación en los valores del equilibrio ácido-base sanguíneo, todos los datos obtenidos se mantuvieron dentro de los límites normales para la especie, esto no es sorprendente si tenemos en cuenta que el mantenimiento de la homeostasis ácido-base tiene una prioridad fisiológica mayor que la gestación o la lactación (Hannon *et al.*, 1990; Fauchon, 1995; DeRouchey *et al.*, 2003).

En avicultura también se ha trabajado en extenso sobre la influencia de la variación de la DED sobre el equilibrio ácido-básico sanguíneo. Los resultados de dichos estudios han mostrado una enorme similitud con los obtenidos para el caso del porcino, observándose una disminución progresiva del pH y de la reserva alcalina dentro de los límites normales a medida que se producía la disminución de la DED y viceversa (Mongin y Saveur, 1977; Mongin, 1981; Gezen *et al.* 2005). Un caso excepcional lo constituye el trabajo de Johnson y Karunajeewa (1985) que indujeron una fuerte acidosis (marcada disminución del pH, del  $pCO_2$  y del  $HCO_3^-$ ) cuando administraron una dieta con un DED de -29 mEq/kg.

AUTOR	Animal	DED (mEq/kg MS)	pH sangre	pH orina	$pCO_2$
Patience <i>et al.</i> (1987)	Cerdos	-85	7,09		74,2
		0	7,16		70,1
		+100	7,16		76,7
		+175	7,20		73,9
		+277	7,19		74,8
		+341	7,21		72,5
Haydon <i>et al.</i> (1990)	Cerdos	25	7,173		69,38
		100	7,192		72,41
		175	7,224		69,08
		250	7,236		68,74
		325	7,202		74,16
		400	7,240		71,23
Budde y Crenshaw (2003)	Cerdos	-35	7,478		36,91
		+112	7,485		38,20
		+212	7,526		38,53
Johnson y Karunajeewa (1985)	Pollos	-29	7,105		45,6
		+180	7,234		59,2
		+344	7,223		53,8
Gezen <i>et al.</i> (2005)	Pollos	+80	7,36		42,64
		+170	7,44		43,81
		+256	7,45		46,69
		+330	7,50		53,85

**Tabla 19:** Cambios en el pH sanguíneo y urinario y  $pCO_2$  en función de diferentes DED en cerdos y en pollos

AUTOR	Animal	DED (mEq/kg MS)	pH sangre	pH orina	pCO <sub>2</sub>
Van Mosel <i>et al.</i> (1993)	Vacas	+572,5 -4		8,40 7,05	41,4 40,8
Ross <i>et al.</i> (1994)	Vacas	Día 42:			
		0	7,38		32,49
		+150	7,44		32,52
		+300	7,43		31,07
		+450	7,42		32,93
		Día 84:			
		0	7,44		29,70
		+150	7,45		30,15
		+300	7,46		30,85
		+450	7,45		33,06
Goff y Horst (1997)	Vacas	+461	7,85	8,23	
		+408	7,41	8,09	
		+222	7,47	7,99	
		+202	7,40	7,85	
		-54	7,36	5,70	
		-98	7,37	5,80	
Joyce <i>et al.</i> (1997)	Vacas	+35	7,44	8,29	34,7
		+30	7,44	8,09	34,4
		-7	7,43	7,63	34,4
Goff y Horst (1998)	Vacas	+86,3	7,41	8,1	
		-91,3	7,35	5,6	
Vagnoni y Oetzel (1998)	Vacas	+203	7,42	8,33	40,7
		-40	7,41	6,89	39,1
		-51	7,41	6,37	37,7
		-63	7,39	7,20	40,7
Moore <i>et al.</i> (2000)	Vacas	+150	7,58	7,98	25,7
		0	7,58	7,35	25,5
		-150	7,54	6,22	24,2

**Tabla 20:** Cambios en el pH sanguíneo y urinario y pCO<sub>2</sub> en función de diferentes DED en vacas según diversos autores

Abu Damir *et al.* (1991) llevaron a cabo experiencias similares en corderos y observaron que la dieta aniónica inducía un pH sanguíneo y urinario así como un nivel de exceso de bases mucho menor que la dieta catiónica, resultados similares fueron hallados por Espino *et al.* (2003) trabajando con ovejas en el periodo de tiempo que rodea al parto.

En el 2003, Roche *et al.* descubren, trabajando en ganado vacuno, que al hacer disminuir la DCAD desde valores de 1270 mEq/kg hasta 210 mEq/kg aparece un valor umbral (en torno a 520 mEq/kg) a partir del cual disminuyen los valores de pH sanguíneo y por encima del mismo los valores de pH sanguíneo parecen no variar. En este mismo estudio la diferencia de iones fuertes en sangre y el bicarbonato descienden de un modo lineal al disminuir la DCAD. La existencia de este valor umbral demostraría la capacidad del organismo de resistirse a grandes cambios en su medio interno sin que su pH sanguíneo se vea alterado (Roche *et al.*, 2003a). Por otro lado, la presencia de dicho valor no resultó evidente en trabajos previos ni en los estudios llevados a cabo en cerdos y en aves, lo que podría deberse a que en dichos estudios no se administraran raciones con una DCAD lo suficientemente alta (Escobosa *et al.*, 1984; Tucker *et al.*, 1988; West *et al.*, 1991).

En perro aunque no se ha trabajado apenas con el concepto de diferencia electrolítica de la dieta existen diversos estudios que coinciden en afirmar que puede producirse acidosis metabólica fácilmente administrando cloruro amónico por vía oral (Magner *et al.*, 1988; Shaw, 1989; Schober, 1996). De hecho, Shaw (1989) y Schober (1996) verificaron la capacidad de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para producir acidificación urinaria y acidosis metabólica concurrente.

Schober en 1996 administró 100 mg/kg de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  por vía oral en perros cada 12 horas durante 8 días consecutivos y observó una disminución significativa del pH sanguíneo a las 6 horas tras la administración de la primera dosis, que se acompañó de una disminución significativa de la concentración de bicarbonato. Después de este marcado descenso inicial, el pH y la concentración de bicarbonato fueron aumentando progresivamente hasta alcanzar los valores de referencia el día 7. En este estudio la acidosis metabólica va haciéndose menos notoria entre los días 2 y 8, los autores explican este hecho como una compensación de la carga ácida administrada de forma crónica dependiente del tiempo, particularmente a través de un incremento del pH mediado por la síntesis de glutamina<sup>1</sup> en el hígado, y un aumento eficaz de la amoniogénesis renal. Estos resultados apoyan los obtenidos por Shaw (1989) quienes observaron la aparición de acidemia en sangre venosa en las dos horas de la administración de 200 mg/kg vía oral de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Sin embargo, Senior *et al.* (1984) no

---

<sup>1</sup> El amoníaco se produce a partir del metabolismo renal de la glutamina. Cada molécula de glutamina produce dos moléculas de  $\text{NH}_4^+$  y un anión divalente. En última instancia, es el metabolismo completo de este ión divalente el que produce el nuevo bicarbonato. Ante una acidosis sistémica, se estimulan las enzimas responsables del metabolismo de la glutamina. Debido a esta respuesta adaptativa, el riñón puede aumentar la excreción de  $\text{H}^+$  y producir nuevo bicarbonato para intentar compensar la acidosis (Berne y Levi, 1992).

detectaron la aparición de cambios en el pH sanguíneo a pesar de que sí observaron una disminución de la concentración de bicarbonato.

Madias y Zelman (1986) administraron durante 8 días HCl con la dieta una vez al día y comprobaron que se producía un aumento de la concentración de  $H^+$  y una disminución de la concentración de  $HCO_3^-$  en las horas siguientes a la administración de la dieta, después ambos parámetros retornaban a los valores normales antes de la administración de la siguiente toma de alimento.

### **3.7.3.1. MECANISMOS COMPENSADORES FRENTE A LOS CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE IÓN HIDRÓGENO: AMORTIGUADORES DE LOS LÍQUIDOS ORGÁNICOS, PULMONES Y RIÑONES**

Existen tres sistemas primarios que regulan la concentración de  $H^+$  en los líquidos orgánicos para evitar tanto la acidosis como la alcalosis: 1) los sistemas de amortiguación ácido-básicos químicos de los líquidos orgánicos, que se combinan de forma inmediata con un ácido o con una base para evitar cambios excesivos en la concentración de  $H^+$ ; 2) el centro respiratorio que regula la eliminación de  $CO_2$  del LEC, y 3) los riñones que pueden variar el pH urinario para normalizar la concentración de  $H^+$  del LEC tanto en casos de acidosis como de alcalosis (Guyton y Hall, 2006b).

#### **3.7.3.1.1. SISTEMAS AMORTIGUADORES DE LOS LÍQUIDOS ORGÁNICOS**

En este epígrafe englobamos tanto a los sistemas de amortiguación extracelulares como intracelulares. La respuesta de los estabilizadores extracelulares es prácticamente instantánea, mientras que el proceso intracelular es algo más lento y puede tardar varios minutos en completarse (Koeppen y Stanton, 2006).

Cuando se produce un cambio en la concentración de  $H^+$ , los sistemas amortiguadores de los líquidos orgánicos reaccionan en una fracción de segundo para contrarrestar las desviaciones. Los sistemas amortiguadores no eliminan ni añaden iones  $H^+$  al organismo, sino que se limitan a capturarlos hasta que se restablece el equilibrio. Por este motivo, un amortiguador se define como cualquier sustancia capaz de unirse de forma reversible a los  $H^+$  (Guyton y Hall, 2006b).

El sistema amortiguador del bicarbonato es el sistema más importante que actúa en el LEC. Cuando se añaden ácidos no volátiles a los líquidos corporales (o se pierden bases del

organismo), se consume  $\text{HCO}_3^-$  en el proceso de neutralización del ácido reduciéndose la concentración del mismo en el LEC. Por el contrario, si se añade una base no volátil a los líquidos corporales (o se pierde un ácido del organismo) se consume  $\text{H}^+$ , lo que genera más  $\text{HCO}_3^-$  a partir de la disociación del  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (Koeppen y Stanton, 2006).

Aunque el principal sistema de amortiguación en el LEC es el  $\text{HCO}_3^-$ , los fosfatos y las proteínas plasmáticas aportan sistemas extracelulares complementarios. El resto de la amortiguación es intracelular, lo que implica la entrada de  $\text{H}^+$  a las células (amortiguación de ácidos no volátiles) o la salida de  $\text{H}^+$  de las células (amortiguación de bases no volátiles). El  $\text{H}^+$  es “titulado” dentro de la célula por el  $\text{HCO}_3^-$ , el fosfato y grupos histidina de las proteínas (Koeppen y Stanton, 2006).

Finalmente, el hueso, como veremos más adelante, representa otra fuente de estabilizadores extracelulares, ya que actúa amortiguando el exceso de iones  $\text{H}^+$  durante la administración de ácido (Koeppen y Stanton, 2006). Algunos investigadores atribuyeron este efecto al carbonato óseo (Barzel, 1969; Burnell, 1971) y otros a los fosfatos minerales y al bicarbonato óseo (Bushinsky *et al.*, 1999). El mecanismo de acción, descrito de forma generalizada, se basa en que en situaciones de acidosis las sales cálcicas liberan calcio para unirse a los  $\text{H}^+$  produciéndose desmineralización del hueso (Koeppen y Stanton, 2006). Posteriormente veremos, además, que en situaciones de acidosis crónica existen indicios de que también puede tener lugar una destrucción ósea mediada por células.

### 3.7.3.1.2. PULMONES: COMPENSACIÓN RESPIRATORIA

El segundo mecanismo frente a los trastornos del equilibrio ácido-básico es el control que ejercen los pulmones sobre el  $\text{CO}_2$  del LEC. Un incremento de la ventilación elimina  $\text{CO}_2$  del organismo, por lo que a través de la siguiente ecuación, disminuye la cantidad de  $\text{H}^+$  (Guyton y Hall, 2006b).



La ecuación anterior muestra la disminución de la cantidad de  $\text{H}^+$  cuando la reacción se desplaza hacia la derecha, aumentando el  $\text{CO}_2$ , esta molécula a su vez estimula el centro de la respiración lo que hace que incremente su eliminación pulmonar disminuyendo progresivamente la cantidad de hidrogeniones del líquido extracelular.

A continuación, y después de este breve recuerdo fisiológico, resumimos los resultados más relevantes encontrados en diferentes estudios tras la suplementación dietética con sales aniónicas o catiónicas.

En cuanto a la participación o no de la respiración en la compensación de la acidosis metabólica provocada por la administración de las sales en vacuno, especie dónde más se ha estudiado este tema, existen resultados claramente encontrados. Por un lado contamos con un conjunto de trabajos en los que la administración de sales aniónicas en la dieta produce un descenso significativo de los valores de  $p\text{CO}_2$  en sangre (Tucker *et al.*, 1992; Joyce *et al.*, 1997; Gant *et al.*, 1998; Schonewille *et al.*, 1999). Estos estudios apoyan la teoría de que el organismo responde a la existencia de acidosis de origen metabólico mediante una leve hiperventilación y reducción de los valores de la  $p\text{CO}_2$  con el fin de que el pH retorne a sus valores normales (Bailey y Pablo, 1998). En otro grupo de experimentos, diferentes investigadores afirman que la acidosis metabólica inducida por la dieta es compensada completamente por mecanismos no respiratorios, por lo que no se perciben diferencias en las concentraciones de  $p\text{CO}_2$  (Van Mosel *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 1994; Vagnoni y Oetzel, 1998; Roche *et al.*, 2003a). La mayor limitación de todos estos trabajos es que exceptuando a Ross *et al.* (1994), el resto de los investigadores utilizaron sangre venosa para valorar el componente respiratorio de la homeostasis acido-básica lo que reduce la exactitud de los resultados.

En el caso del porcino, Patience *et al.* (1987) observaron que la  $p\text{CO}_2$  se mantuvo más o menos constante al aplicar 6 dietas con diferente DED, con lo cual no constataron una compensación respiratoria evidente. Haydon *et al.* (1990) y DeRouchey *et al.* (2003) encontraron un aumento lineal del  $\text{CO}_2$  total al aumentar la DED y Budde y Crenshaw (2003) verificaron una disminución de la  $p\text{CO}_2$  con el descenso de la DED, lo que en principio parece estar en concordancia con algún tipo de compensación respiratoria.

En gallinas ponedoras, Gezen *et al.* (2005) no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la  $p\text{CO}_2$  al aplicar dietas que presentaban DED de 80, 170, 256 y 330 mEq/kg. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Abu Damir *et al.* (1991) trabajando con corderos y con los de Schober (1996) el cual indujo acidosis metabólica mediante la administración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en perros. Madías y Zelman (1986), trabajando con esta misma especie, encontraron disminuciones significativas de este parámetro en las horas siguientes a la administración de ácido clorhídrico con la dieta, comprobando después que la  $p\text{CO}_2$  iba aumentando progresivamente hasta retornar a los valores preprandiales antes de 24 horas.

En lo que respecta a la concentración de  $\text{CO}_2$ , dado que refleja variaciones de la  $\text{pCO}_2$  y de la concentración de  $\text{HCO}_3^-$ , normalmente sufre un aumento con el incremento de la DED (DeRouche *et al.*, 2003).

Finalmente, en cuanto a la  $\text{pO}_2$  no se han descrito variaciones estadísticamente significativas con las modificaciones de la DED, aunque no hemos analizado este parámetro en profundidad debido probablemente a que no presenta ningún papel en la compensación del equilibrio ácido-base (Patience y Chaplin, 1997; DeRouche *et al.*, 2002).

### 3.7.3.1.3. RIÑÓN Y FORMACIÓN DE ORINA

El riñón supone la tercera y última línea de defensa frente a los trastornos ácido-básicos.

- En el caso de la acidosis los riñones aumentan la secreción de  $\text{H}^+$  por la nefrona y mantienen la concentración normal de  $\text{HCO}_3^-$  en el LEC, elevando la reabsorción de prácticamente todo el  $\text{HCO}_3^-$  filtrado y regenerando nuevamente aquel que ha sido titulado durante la producción endógena diaria de ácido fijo o no volátil. Este último proceso se logra por medio de la excreción de acidez titulable<sup>2</sup> (principalmente sales de fosfato) y sales de amonio, es decir, que se produce un incremento de la excreción neta de ácido<sup>3</sup>. El nuevo  $\text{HCO}_3^-$  generado durante el proceso vuelve al organismo y de esta manera aumenta la concentración plasmática de  $\text{HCO}_3^-$ . De este modo, y en resumen, los riñones regulan la concentración de  $\text{H}^+$  en el líquido extracelular mediante tres mecanismos básicos: 1) secreción de  $\text{H}^+$ , 2) reabsorción del  $\text{HCO}_3^-$  filtrado y 3) producción de nuevo  $\text{HCO}_3^-$  (Guyton y Hall, 2006b).
- Cuando hay una alcalosis, por el contrario, se inhibe la secreción de  $\text{H}^+$  por la nefrona y, en consecuencia, disminuyen la excreción neta de ácido y la reabsorción de  $\text{HCO}_3^-$ . Aparecerá  $\text{HCO}_3^-$  en la orina y disminuirá la concentración plasmática del mismo (Koeppen y Stanton, 2006).

Los diferentes investigadores han constatado este tipo de actuación renal cuando aplicaban las sales aniónicas y catiónicas en las diferentes especies:

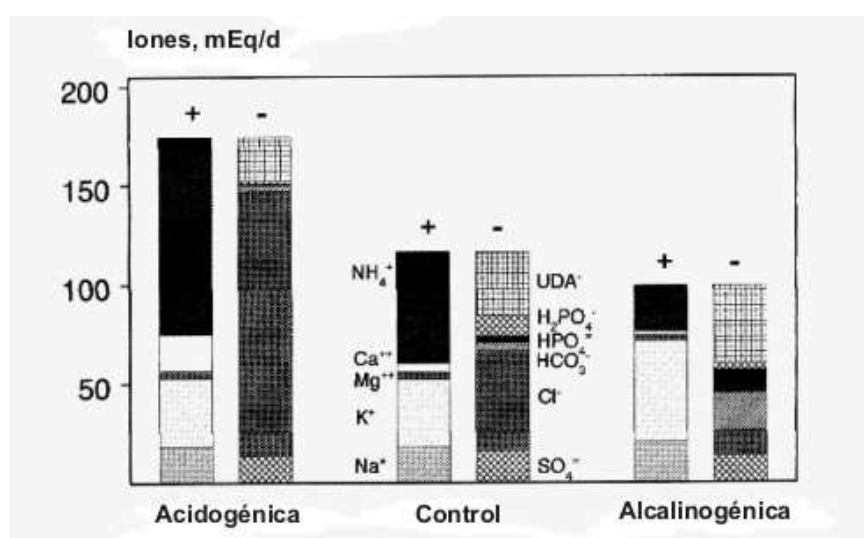
<sup>2</sup> La acidez titulable se refiere a la cantidad de base fuerte que es necesaria para titular una muestra de orina de 24 horas a un pH de 7,40 y representa la cantidad de  $\text{H}^+$  excretada en la orina en combinación con aniones ácidos débiles, principalmente fosfato. Cuando el pH de la orina es muy bajo otros ácidos débiles como la creatinina y el urato contribuyen a la acidez titulable (DiBartola, 2002).

<sup>3</sup> El término excreción neta de ácido se define como la suma de la acidez titulable más el amonio menos la excreción urinaria de bicarbonato (DiBartola, 2002).



Los trabajos consultados en ganado vacuno describen que, tras la administración de sales aniónicas, las variaciones en los parámetros ácido-básicos urinarios muestran la respuesta renal típica a un estado de acidosis metabólica (Knepper y Burg, 1988). En esta situación, se incrementa la reabsorción tubular de bicarbonato, aumenta la producción y excreción de amonio y, por tanto, es mayor la excreción neta de ácido en orina (Goff y Horst, 1997; Vagnoni y Oetzel, 1998; Schoenwille *et al.*, 1999).

En porcino se ha encontrado una respuesta similar, puesto que la administración de dietas de baja DED provoca la aparición de una compensación renal clara, con una disminución significativa del pH urinario y aumento de la excreción neta de ácido ( $\text{NH}_4^+ + \text{H}_2\text{PO}_4^- - \text{HCO}_3^-$ ), ya que como hemos mencionado para el caso del vacuno aumenta la excreción de amonio mientras que disminuye la de  $\text{HCO}_3^-$  (Budde y Crenshaw, 2003; DeRouchey *et al.*, 2003).



**Figura 8:** Cantidad de cationes y aniones urinarios excretados en cerdos alimentados con una dieta acidogénica (-35 mEq/kg), control (112 mEq/kg) y alcalinogénica (212 mEq/kg) (Budde y Crenshaw, 2003)

Budde y Crenshaw en el 2003 afirmaron que cambios en la excreción urinaria de aniones y cationes nos ofrecen una idea de la compensación renal de las cargas ácidas o alcalinas aportadas a través de la dieta. La figura nº 8 nos proporciona un resumen de los principales aniones y cationes excretados a través de la orina, podemos observar como aumenta el  $\text{NH}_4^+$  con el incremento de la carga ácida, mientras que el  $\text{HCO}_3^-$  disminuye. El fosfato monofásico urinario así como la excreción de fosfato urinario total, fueron diferentes entre los

tratamientos, pero no presentaron una relación directamente proporcional con la carga ácida. El  $\text{SO}_4^{2-}$ , el anión no determinado, el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y el N total no presentaron diferencias entre los grupos. La excreción de cloro urinaria fue aumentando conforme la acidificación era mayor.

En perros se han realizado diversos estudios en los que se indujo un estado de acidosis metabólica a través de la administración de sustancias acidificantes por vía oral. Por ejemplo, Madias y Zelman (1986) provocaron la aparición de acidosis metabólica mediante la administración de HCl con la dieta y constataron un aumento significativo de la excreción neta de ácido. En cuanto a las modificaciones en el pH urinario contamos con los siguientes datos de autores que trabajaron con la administración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ :

- Schober (1996) encontró una disminución significativa del pH urinario a lo largo de toda la duración de su estudio (8 días).
- Shaw (1989) comprobó que el pH urinario disminuía dentro de las 4 primeras horas tras la administración del preparado. Este estudio fue realizado en perros a los que se les administró una única dosis.
- Senior (1984) encontró que el descenso del pH urinario aparecía a los 4 días del comienzo de la administración del cloruro amónico.

En perros no disponemos de información a cerca de si existe una correlación estrecha entre los valores del pH urinario y de la excreción neta de ácido, en cambio este hecho si que se ha demostrado en el caso de rumiantes alimentados con sales aniónicas ( $r^2=0,95$ ;  $p<0,001$ ) (Vagnoni y Oetzel, 1998). Este hallazgo sugiere que la determinación del pH urinario puede ser una herramienta útil para valorar el grado de acidosis metabólica inducida por la DCAD negativa en el caso de rumiantes.

En 1991 Shaw *et al.* indujeron artificialmente una acidosis metabólica mediante la administración intraósea de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en perros y analizaron el *anion GAP* urinario calculado como  $\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ , encontrando una fuerte relación inversa con la excreción urinaria de amonio ( $\text{NH}_4$ ). Por tanto, el *anion GAP* urinario resultó un índice fiable de la concentración y excreción de  $\text{NH}_4$  por parte del riñón, pero esta situación sólo se verificó en el momento en que los perros presentaban acidosis metabólica, ya que esta no resultó evidente antes de la administración del  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

En el año 2007 nuestro equipo de investigación realizó un estudio en perros a los que se les administraba dos dietas comerciales de diferente DED, en este trabajo pudimos comprobar como la dieta con menor DED producía un descenso significativo en el pH urinario pero en ningún momento este parámetro presentaba una correlación positiva con el pH sanguíneo, con lo cual concluimos que bajo estas circunstancias la determinación de pH urinario no puede considerarse un buen indicador de los cambios que acontecen en el pH arterial (Rodríguez *et al.*, 2007a).

### **3.7.4. EFECTOS SOBRE LA DIFERENCIA ELECTROLÍTICA PLASMÁTICA**

A continuación y en consonancia con los resultados obtenidos por los diferentes estudios que hemos manejado, exponemos influencia que presenta la variación de la DED sobre las concentraciones plasmáticas de sodio, cloro y potasio.

#### **3.7.4.1. EFECTOS SOBRE EL CLORO**

Antes de comenzar con el desarrollo de este apartado debemos tener en cuenta que en los estudios revisados las condiciones de trabajo son muy dispares, no sólo porque trabajan con especies animales diferentes sino también con concentraciones de sales muy distintas dependiendo del fin último de la investigación.

Dersjant-Li *et al.* (2001a) encontraron que en el cerdo la concentración plasmática de  $\text{Cl}^-$  era significativamente mayor en aquellos animales alimentados con una DED de -100 respecto a otros grupos a los que se les suministró dietas con DED de 200 y de 500 mEq/kg. Estos resultados coinciden con las observaciones de Yen *et al.* (1981), Patience y Wolynetz (1990), Patience y Chaplin (1997) y DeRouche *et al.* (2003). Hallazgos similares fueron encontrados en pollos por Simons *et al.* (1987), los cuales observaron un aumento de la cloremia al elevar el contenido en cloro de la dieta. De modo que, en principio, la elevación de las concentraciones plasmáticas de cloro puede estar relacionada en ambas especies con el aumento en contenido en cloro de las dietas de menor DED (Dersjant-Li *et al.*, 2001a; Gezen *et al.*, 2005). Con anterioridad Patience y Chaplin (1997) compararon una dieta con una DED de -20 mEq/kg con otra que contaba con una DED de 104 mEq/kg, presentando ambas dietas un contenido en  $\text{Cl}^-$  similar, pero la segunda de ellas poseía un contenido adicional de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$ . Estos investigadores encontraron que la concentración sérica de  $\text{Cl}^-$  era significativamente mayor en la dieta con una DED de -20 mEq/kg. Este trabajo indica que la concentración de  $\text{Cl}^-$  plasmática está influida por la DED además de por el contenido en  $\text{Cl}^-$

de la dieta. Kemme-Kroonsberg (1993) explicó este fenómeno en relación con el aumento de la DED de la dieta, argumentando que cuando el  $\text{HCO}_3^-$  aumentaba en el plasma, una cantidad equivalente de  $\text{Cl}^-$  tenía que ser excretada con el fin de mantener la electroneutralidad del LEC.

Resultados opuestos a los mencionados fueron los hallados de Monghaddam *et al.* (2005) en gallinas jóvenes, estos autores encuentran que al incrementar la DED de 187 a 284 mEq/kg se produce un aumento progresivo de los niveles de  $\text{Cl}^-$ , pero estos autores no llegan a aportar ninguna explicación firme que justifique la obtención de sus resultados.

En perros se han realizado algunos estudios administrando cloruro amónico, no como sal aniónica sino como acidificante urinario. La administración de esta sustancia provocó la aparición de alteraciones en la concentración plasmática de cloro, de este modo, la administración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a una dosis de 5 mmol/kg dos veces al día durante 6 días produjo la aparición de acidosis metabólica hiperclorémica que además se asoció con hipocalcemia, supuestamente por el aumento de la secreción de aldosterona (Magner *et al.*, 1988).

### 3.7.4.2. EFECTOS SOBRE EL SODIO Y POTASIO

En lo que se refiere a las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  hemos encontrado también estudios contradictorios.

Patience y Chaplin (1997) y Dersjant-Li *et al.* (2001a), trabajando con cerdos, y Johnson y Karunajeewa (1985) y Gezen *et al.* (2005), con pollos, observaron que las concentraciones plasmáticas de estos dos iones no estuvieron influenciadas por la DED. Por otro lado, Haydon *et al.* (1990) así como Patience y Wolynetz (1990) obtuvieron un incremento lineal de la concentración de  $\text{Na}^+$  con el aumento de la DED, mientras que las concentraciones de  $\text{K}^+$  plasmático se mantenían constantes con la aplicación de las diferentes dietas, pero esto puede relacionarse con el hecho de que estos autores incrementaban la DED a través de la adición de sales de sodio. DeRouchey *et al.* (2003) en un ensayo con cerdas lactantes documentaron una disminución del  $\text{K}^+$  con el aumento de la DED y justificaron este hallazgo en base al intercambio de los  $\text{H}^+$  y del  $\text{K}^+$  entre el líquido extracelular e intracelular con los cambios de pH.

Moghaddam *et al.* (2005) trabajaron con 4 DED diferentes (187, 230, 251 y 280 mEq/kg) en gallinas jóvenes, estas variaciones las consiguieron mediante la acción de sales catiónicas que modificaban el contenido en  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ ; al analizar los electrolitos sanguíneos encontraron

que la dieta de 251 mEq/kg estaba relacionada con unos niveles significativamente inferiores de  $K^+$ . Esta respuesta la justificaron debido a que la tercera dieta presentaba un mayor contenido en  $Na^+$  y, al ser estos dos electrolitos monovalentes antagonistas a nivel intestinal, podía uno bloquear la absorción del otro.

Schober (1996) trabajó con perros a los que administró  $NH_4Cl$  a razón de 100 mg/kg dos veces al día, durante 8 días, y encontró una disminución de las concentraciones plasmáticas de sodio hasta el día 4. El autor justifica esta disminución porque la acidosis conlleva un aumento de la excreción del volumen urinario que se acompaña de natriuresis, lo que puede provocar un incremento en la pérdida de sodio corporal. En lo que respecta al  $K^+$ , este autor no encontró modificaciones en sus concentraciones plasmáticas durante la administración de dicha sustancia.

Aunque en el trabajo de Schober (1996) que acabamos de citar no se obtuvieron modificaciones evidentes en las concentraciones de potasio, a lo largo de esta revisión hemos encontrado trabajos en los que ha constatado un aumento de las mismas mientras que otros estudios reportan lo contrario. Por ejemplo, Toussaint y Vereerstraeten (1962) y DiBartola (1993) observaron que durante episodios de acidosis se producía un aumento de las concentraciones de potasio en plasma y justificaron estos hallazgos por la traslocación de  $K^+$  desde la célula hacia el espacio extracelular, que se produce como primera barrera de defensa para evitar la caída brusca de pH. Guyton y Hall (2006a) describen que esta hiperpotasemia que se produce en casos de acidosis aguda también es debida a que los iones  $H^+$  inhiben la actividad de la bomba  $Na^+/K^+$  de la membrana basolateral de las células tubulares, lo que disminuye la concentración de dicho electrolito en el interior de las células y dificulta su difusión pasiva hacia la luz tubular.

Por el contrario Rose y Carter (1980) describen una caída en el  $K^+$  y en el  $Na^+$  plasmático en relación con la acidosis en perros, que justifican por el incremento de la excreción renal de estos electrolitos.

La explicación a la variación de las concentraciones de  $K^+$  durante situaciones de acidosis la encontramos en un artículo publicado por Magner *et al.* (1988) que realizaron un estudio sobre acidosis metabólica aguda y crónica inducida en perros mediante la administración de HCl o  $NH_4Cl$ . Dichos autores observaron hipercalemia después de la infusión aguda de HCl, pero encontraron aparición de hipocalemia tras varios días de administración de cloruro amónico; estos investigadores explican tal resultado como consecuencia del aumento de la

secreción de aldosterona, esta hormona favorece la eliminación de  $H^+$  al líquido tubular favoreciendo a su vez la pérdida de potasio. Guyton y Hall (2006a) nos ofrecen una explicación complementaria para este mismo fenómeno, ya que en los casos de acidosis crónica se inhibe la reabsorción tubular proximal de cloruro de sodio y de agua, lo que aumenta el volumen que llega a tramos distales, estimulando así la secreción de potasio a este nivel.

Finalmente mencionar que Borges *et al.* (2003) trabajando con dietas que presentaban una DED de 40, 140, 240 y 340 mEq/kg en broilers no encontraron diferencias en lo que respecta a ninguno de los electrolitos ( $Cl^-$ ,  $Na^+$  y  $K^+$ ), aunque en ningún momento trabajaron con DED negativas.

Electrolito	Valores normales en perro (mEq/L)
Sodio	141-155
Potasio	4-5,6
Cloro	105-120

**Tabla 19:** Valores fisiológicos de electrolitos en el plasma canino (Russell *et al.*, 1996)

### 3.7.5. EFECTOS SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO Y SOBRE LOS MARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA

Desde hace años se sabe que la diferencia ácido-básica de la dieta afecta a la mineralización de los huesos en ratas y cobayas (Lemann *et al.*, 1966; Barzel, 1975; Bray y Briggs, 1984; Petito y Evans, 1984; Kraut *et al.*, 1986). Estados de acidosis inducidos por la dieta conducen a la aparición de pérdidas en la mineralización ósea, o dicho de otro modo, el hueso está implicado en el control ácido-básico de los fluidos corporales como sistema tampón (Fredeen *et al.*, 1988a y b; Eiam-ong y Kurtzman, 1994; Green, 1994).

Aunque esta acción ha sido comprobada en múltiples ocasiones no siempre ha podido detectarse dicho efecto sobre el hueso, por ejemplo, Budde y Crenshaw (2003) quisieron probar la influencia de la DED sobre la resorción y la formación ósea administrando tres dietas diferentes (aniónica, control y catiónica) a tres grupos de cerdos en crecimiento. Estos investigadores partieron de la teoría de que la carga metabólica ácida es amortiguada mediante un incremento de la resorción ósea o por una disminución en su formación, por lo

que al descender la DED esperaban encontrar una disminución de los siguientes parámetros: calcio y fosfato retenido, ganancia de contenido mineral óseo, cenizas óseas y resistencia a la fractura del hueso. Sin embargo, los datos que obtuvieron no apoyan este tipo de implicación ósea, aunque el tiempo de aplicación de las dietas fue solamente de dos semanas este periodo fue suficiente para lograr que el peso corporal y el CMO se duplicasen en los animales en estudio, pero aún así no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos. Estos autores concluyeron que el CMO no disminuye con el fin de amortiguar las cargas ácidas aportadas por la dieta. Es preciso mencionar, que en este estudio no emplearon cortes histológicos para evaluar la remodelación del hueso, ni tampoco utilizaron marcadores de formación ni de resorción ósea.

A pesar de este trabajo, en la actualidad la teoría más aceptada es que los estados de acidosis conducen a la aparición de pérdidas en el CMO, mientras que estados de alcalosis conducen a la aparición de la situación inversa. Esta situación es atribuible a dos posibles circunstancias:

**Respuesta de la parte inorgánica del hueso a la acidosis metabólica:** esta teoría sostiene que bajo situaciones de acidosis se produce una desmineralización del hueso como respuesta a la disminución del pH local, pero sin verse afectada la matriz ósea.

A continuación resumimos algunos de los estudios más relevantes que apoyan esta teoría. Es necesario destacar que algunos de ellos ya comienzan a trabajar con marcadores de formación y de resorción ósea:

En medicina humana Wachman y Bernstein sugirieron en 1968 que el incremento de incidencia de la osteoporosis con la edad puede ser debido, en parte, a la utilización a largo plazo de la capacidad tampón de las sales básicas del hueso para el mantenimiento de la homeostasis ácido-base.

Posteriormente Domínguez y Raisz (1979) plantearon un estudio en huesos fetales de rata premarcados con  $^{45}\text{Ca}$  y encontraron que variando el pH del medio entre 6,9 y 7,5, las concentraciones de  $\text{H}^+$ ,  $\text{CO}_2$ , y  $\text{HCO}_3^-$  no presentaban influencia sobre la resorción ósea mediada por células. Por otro lado, el calcio liberado a partir de huesos desvitalizados estuvo relacionado linealmente con la concentración de  $\text{H}^+$ . Estos autores concluyeron que sus datos no sustentan la teoría de que la acidosis (aguda o crónica) estimula directamente la resorción mediada por osteoclastos.

Trabajando con ratas Kunkel *et al.* (1986) hallaron en aquellas que consumían una dieta ácida, al compararlas con las que recibían una ración control, una reducción en el contenido en calcio del fémur sin que se viese afectada la matriz ósea. Esta observación la atribuyeron a la disolución de cristales amorfos de fosfato cálcico en la superficie del hueso.

Entrando ya en el grupo de investigadores que han trabajado con el concepto de DCAD en rumiantes, nos encontramos con los siguientes trabajos:

Joyce *et al.* (1997) administraron en vacas en torno al parto dietas con diferente DCAD y no encontraron diferencias estadísticamente significativas de las concentraciones de hidroxiprolina en suero, indicando que la mejoría en el estatus cálcico de las vacas puede no estar asociado solamente con el efecto de las sales aniónicas sobre el hueso. Estos resultados coinciden con los hallados por Roche *et al.* (2003b).

En el año 2004 MacLeay *et al.* realizaron un estudio en ovejas empleando una dieta con una DCAD de 308 mEq/kg y otra de -465 mEq/kg durante 180 días. Dichos investigadores comprobaron la disminución significativa de la DMO por DEXA a nivel lumbar, en cambio este descenso no se vio acompañado de alteraciones significativas de la fosfatasa alcalina de origen óseo ni de la deoxipiridinolina en orina, no pudiendo poner en evidencia el aumento de la resorción ósea mediada por células.

Recientemente Liesegang *et al.* (2007) estudiaron las variaciones del TCTI (marcador de resorción ósea) en vacas divididas en dos grupos durante el periodo peripartal, en cada grupo empleó una ración con diferente DCAD (-48 mEq/kg y 28 mEq/kg). Este equipo investigador comprobó que el TCTI aumenta en ambos grupos después del parto, pero que no se producen diferencias estadísticamente significativas en lo que respecta a este parámetro. Por este motivo no pudieron concluir que la DCAD tenga efecto sobre la movilización activa del calcio óseo.

Mecanismo de acción: la acidosis metabólica además de tender a disminuir el pH sanguíneo también tiende a bajar el pH en el ambiente local del hueso lo que conduce a la disolución mineral físico-química. De este modo, las dietas acidificantes inducen la liberación de cationes (incluido el calcio) a la sangre que se intercambian por los  $H^+$ , con el fin de amortiguar cambios en su pH. La resorción de la



hidroxiapatita ósea consume 9,2 moles de ácido por cada 10 moles de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado. Asimismo la resorción de  $\text{HPO}_4^{2-}$  desde la hidroxiapatita bajo condiciones fisiológicas amortigua también parte de la carga ácida mediante el consumo de un protón, de este modo se forma  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  que es excretado posteriormente (Brosnan y Brosnan, 1982).

**Incremento de la resorción ósea mediada por células:** los autores que apoyan esta teoría afirman que estados de acidosis producen una disminución de la actividad de los osteoblastos y el aumento de la actividad osteoclástica (Arnett y Dempster, 1986; Bushinsky, 1994; Bushinsky *et al.*, 1999; Bushinsky y Frick, 2000; Meghji *et al.*, 2001), mientras que estados de alcalosis producirán el efecto inverso (Bushinsky, 1996).

Para intentar corroborar esta teoría se han realizado múltiples estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, a continuación exponemos un resumen de los más relevantes.

**Estudios realizados *in vitro*:** entre el gran número de estudios publicados debemos destacar los siguientes:

Arnett y Dempster (1986) estudiaron los efectos de las modificaciones del pH sobre la resorción ósea mediada por células. Cultivaron osteoclastos aislados de hueso de rata sobre láminas de hueso bovino, tanto en un medio ácido como en un medio neutro, encontrando un incremento significativo de las áreas de resorción en el medio ácido.

En 1987 Goldhaber y Radadjija describieron un aumento de la liberación de calcio en cultivos de cráneo de ratón en medio ácido respecto al cultivo en un medio neutro. Después consiguieron la reducción significativa de dicha liberación al administrar un inhibidor de la actividad osteoclástica. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Meghji *et al.* (2001) quienes comprobaron un bloqueo de la liberación de calcio al añadir calcitonina de salmón, lo que implicaría una participación osteoclástica en la liberación de calcio.

Krieger *et al.* (1992) comprobaron, en cultivos de cráneo de ratón, que estados de acidosis inducen un aumento de la liberación de calcio a través de mecanismos físico-químicos y de mecanismos mediados por células, constatando que en medio ácido se produce una disminución significativa de la síntesis de colágeno y de la actividad de la fosfatasa alcalina.

Con posterioridad Bushinsky y Nilsson (1995) observaron un aumento de la liberación de calcio a partir de tejido óseo cultivado en medio ácido a través del incremento de la liberación de  $\beta$ -glucuronidasa, sustancia empleada para cuantificar la actividad de los osteoclastos.

En 1996 Bushinsky comprobó que cultivando cráneo de ratón en un medio alcalino se produce la disminución de la actividad osteoclástica y el aumento de la formación ósea mediada por osteoblastos.

Recientemente Brandao-Burch *et al.* (2005), en su ensayo sobre cultivos de osteoblastos, constatan que la actividad de la fosfatasa alcalina disminuye ocho veces al descender el pH del medio desde 7,4 a 6,9; este descenso de pH se ve acompañado además por una elevación de las concentraciones calcio y de la solubilidad del fosfato óseo. Así, comprobaron que durante la acidosis metabólica no corregida tiene lugar un descenso del depósito de mineral en el hueso por parte de los osteoblastos *in vitro*.

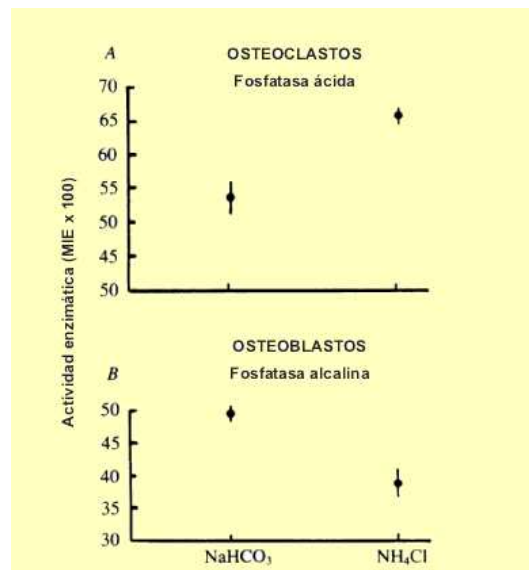
**Estudios realizados *in vivo*:** existen numerosos trabajos realizados *in vivo* que apoyan la teoría de que durante la acidosis crónica se produce un aumento de la liberación de calcio mediada por células. A continuación ofrecemos un breve resumen de los trabajos más relevantes.

En 1984 Kraut *et al.* encontraron que ratas paratiroidectomizadas alimentadas con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  durante 16 horas desarrollaban un incremento significativo del calcio sérico independiente de PTH. Una vez finalizado el experimento los autores administraban a los animales colchicina y calcitonina, constatando una disminución de la liberación de calcio desde el hueso, lo que interpretaron como una abolición de la resorción ósea mediada por células.

Chan *et al.* (1985) trabajaron con ratas urémicas a las que administraron HCl por vía oral durante tres meses. Los animales que recibieron esta sustancia mostraron un aumento de las superficies de resorción y una disminución significativa de las áreas de hueso trabecular comparándolos con el grupo control. Estos cambios óseos estaban asociados a la presencia de elevadas densidades de osteoclastos.

También Kraut *et al.* (1986) trabajaron con ratas paratiroidectomizadas a las que administraron una solución de HCl en el agua de bebida durante dos semanas. Los resultados indicaron que la acidosis metabólica en la rata está asociada con

evidencias histológicas y bioquímicas de aumentos en la resorción y disminuciones de la formación ósea, que fueron además más evidentes en el hueso trabecular de las epífisis que en el cortical de metáfisis. Estos investigadores detectaron también aumentos estadísticamente significativos de la hidroxiprolina en orina.



**Figura 9:** (A) Actividad de la fosfatasa ácida resistente a tartrato en los osteoclastos de la superficie endosteal; (B) Actividad de la fosfatasa alcalina en los osteoblastos del periostio (Abu Damir *et al.*, 1991)

En 1991, Abu Damir *et al.* administraron a dos grupos de corderos una dieta acidificante y una dieta alcalinizante. Después de un tiempo tomaron muestras de costillas y aplicaron dos técnicas que les permitieron conocer *in situ* los niveles de FART (enzima relacionada con la destrucción ósea mediada por células) y de fosfatasa alcalina (enzima asociada a la formación ósea). Los resultados obtenidos muestran un incremento de la resorción ósea y una disminución de la formación en los animales alimentados con la dieta enriquecida en NH<sub>4</sub>Cl.

En medicina humana se han realizado múltiples estudios para intentar comprender mejor el mecanismo de acción de la osteoporosis y los factores que pueden influir sobre la aparición de esta enfermedad. Por ejemplo, se han llevado a cabo trabajos para comprobar la influencia de la administración de bicarbonato o citrato potásico a corto plazo, con el fin de intentar minimizar los efectos de las dietas ácidas sobre el hueso, encontrando que provoca disminución de la excreción neta de ácido y del NTx en orina, de la excreción de hidroxiprolina y del calcio urinario, e incluso aumento de la osteocalcina sérica (Lemann *et al.*, 1989; Sebastian y Morris, 1994; Sellmeyer *et al.*, 2002; Maurer *et al.*, 2003; Jajoo *et al.*, 2006). Por otro lado, la ingestión aguda de

ácido ha sido asociada a aumentos en la excreción neta de ácido de hidroxiprolina, de calcio y a una mayor excreción de CTx (Lemann *et al.*, 1986; Buclin *et al.*, 2001).

*Mecanismo de acción:* En 1990 Rabadjija *et al.* demostraron que los H<sup>+</sup> estimulan la liberación de prostaglandinas E<sub>2</sub> en el cráneo de ratones neonatos y Krieger *et al.* (2000) ratificaron estos resultados. Estos mismos autores en el año 2003 encontraron una clara correlación directa entre el flujo de calcio liberado desde el cráneo de ratones en medio ácido y la cantidad de PE<sub>2</sub> liberada, también observaron un aumento del ARN del factor RANKL<sup>4</sup> siendo esta respuesta prostaglandina dependiente.

Las prostaglandinas son estimuladores potentes de la resorción ósea mediada por células y parecen mediar la resorción inducida por varias citoquinas y factores de crecimiento (Frazier y Yorio, 1990; Raisz, 1993). Bushinsky *et al.* (2001) vieron que este incremento en los niveles de PE<sub>2</sub> se produce sólo en casos de acidosis metabólica, no respiratoria, este hecho justificaría que la liberación de calcio óseo en casos de acidosis respiratoria sea mucho menor.

### 3.7.5.1. EFECTOS SOBRE LAS HORMONAS CALCITROPAS

Actualmente existen pocos trabajos que versen sobre la influencia de la acidosis o de la alcalosis metabólica crónica sobre las hormonas que regulan la homeostasis cálcica en perro. En esta especie, el equipo de investigación en el que se encuentra integrado el Doctor Ignacio López, de la Universidad de Córdoba (España), ha realizado estudios muy valiosos que nos han ayudado a comprender el comportamiento de la PTH en casos de acidosis y alcalosis agudas inducidas experimentalmente a través de la administración parenteral de un ácido o un álcali (López *et al.* 2002; López *et al.* 2003; López *et al.* 2004; López *et al.*, 2006), pero carecemos de estudios crónicos y, lo que es más importante en nuestro caso, de trabajos en los que las variaciones en el equilibrio ácido-básico sean debidas a modificaciones de la DED.

En el perro, en casos de acidosis metabólica y respiratoria aguda, López *et al.* (2004) comprobaron que se produce un incremento de las concentraciones de PTH plasmáticas. Para poder detectar este aumento trabajaron con dos grupos de animales:

---

<sup>4</sup> RANKL: factor osteoclastogénico sintetizado en los osteoblastos.

- En el primero de ellos neutralizaron con EDTA el aumento de calcio plasmático que aparece como consecuencia de la acidosis y así evitaron la disminución de las concentraciones de PTH secundaria al aumento de la concentración de este mineral. De este modo, comprobaron que la acidosis metabólica y respiratoria aguda estimula la secreción de esta hormona.
- En el conjunto de animales restante permitieron que se produjese un aumento de las concentraciones de calcio plasmático, no observando aumentos significativos de las concentraciones de PTH plasmáticas hasta que el pH sanguíneo se disminuyó en gran medida (de 7,26 a 7,22), y aún así, los incrementos detectados fueron de mucha menor entidad que en el primer grupo.

Bichara *et al.* (1990) trabajando con ratas también detectaron un aumento de la PTH como consecuencia de la acidosis metabólica aguda.

En lo que respecta a la alcalosis aguda, López *et al.* en el año 2003 verificaron una disminución de los valores de PTH al generar tanto un trastorno metabólico como respiratorio. Para evitar la interferencia de la disminución de las concentraciones plasmáticas de calcio asociadas a este trastorno, administraron una solución de calcio por vía parenteral con el fin de mantenerlo dentro de su rango normal. Sin embargo, Mercado *et al.* (1975) trabajando con perros no lograron evidenciar este efecto de la alcalosis metabólica aguda sobre la secreción de PTH.

A continuación citaremos diversos estudios realizados a largo plazo en distintas especies y trataremos de agruparlos según los resultados obtenidos. Este tipo de trabajos se han efectuado sobre todo en roedores y en rumiantes como animales de experimentación, puesto que el estudio de las hormonas calciotropas es una de las líneas principales de investigación en aquellos equipos que trabajan en la prevención de hipocalcemias.

Finalmente, haremos referencia a los principales resultados obtenidos en el ser humano, que como veremos difieren bastante de lo encontrado en la investigación con animales.

Los trabajos revisados acerca de este tema los podemos agrupar en cuatro grupos:

1. Existe un grupo de investigadores que están de acuerdo en que bajo situaciones de alcalosis determinados tejidos y órganos, como pueden ser el hueso y el riñón, presentan una menor sensibilidad al efecto de la PTH.

Goff *et al.* (1991) fueron los primeros en poner de manifiesto que las vacas alimentadas con una dieta rica en cationes parecen tener una menor respuesta a la PTH tanto a nivel óseo como renal respecto a las que ingerían las sales aniónicas. En su trabajo, los animales que consumían la dieta catiónica poseían una concentración significativamente mayor de PTH que el grupo que recibía sales aniónicas. Puesto que la PTH es el principal factor estimulador de la  $1\alpha$ -hidroxilasa renal, las vacas con ración catiónica deberían tener unos niveles de calcitriol más altos; sin embargo, la concentración sanguínea de esta hormona fue similar entre los animales que consumían las distintas dietas. De este modo, se supone que la respuesta de los órganos diana a la PTH es mayor cuando existe una ligera acidosis (Goff, 1999; Goff y Horst, 2003).

En 1994, Abu Damir *et al.* encontraron una elevación en la concentración de calcitriol en vacas que consumían la ración aniónica sin que hubiese diferencias en los niveles séricos de calcidiol ni de PTH entre los animales que ingerían las diferentes dietas, lo que confirma una mayor actividad de la  $1\alpha$ -hidroxilasa renal en las vacas con la ración aniónica.

Además de la mayor respuesta de la PTH a nivel de hueso y riñón con la administración de dietas aniónicas, parece ser que la administración de estas sales también puede incrementar la expresión de receptores de vitamina D (RVD) a este nivel. Goff *et al.* (1995) trabajaron investigando las posibles causas que llevaban a la aparición de hipocalcemia en vacas y plantearon que quizá el problema residía en una disminución de receptores de esta vitamina (RVD) a nivel intestinal. Estos autores trabajaron con biopsias de mucosa de colon, basándose en que estudios realizados previamente en ratas indicaban que el número de RVD a este nivel era en torno a un 60-70% del número de receptores a nivel del duodeno (lugar de máxima absorción del calcio) (Goff *et al.*, 1988). En este trabajo comprobaron que las vacas preñadas y lactantes presentaban una cantidad 3 ó 4 veces superior de estos receptores en el colon respecto a las no preñadas y no lactantes, además coincidiendo con el momento del parto se producía una disminución importante de dichos receptores (Goff *et al.* 1990; Goff *et al.* 1995). A mayores, dichos investigadores midieron la presencia de RVD en dos grupos a los que se les administró diferente dieta, uno con ración aniónica y otro con ración catiónica, y

comprobaron que después del parto el grupo alimentado con ración aniónica tenía mayor número de RVD (Goff *et al.* 1995).

2. Otro grupo de autores afirman que la respuesta de la PTH y del calcitriol, cuando se suministran sales aniónicas o catiónicas en la ración, es una respuesta fisiológica normal ante un aumento o disminución de la concentración plasmática de calcio. De este modo, cuando se administra una dieta rica en cationes, las concentraciones plasmáticas de calcio disminuyen y en respuesta a este hecho aumenta la PTH y la 1,25-dihidroxitamina D (Joyce *et al.*, 1997). En ovejas Espino *et al.* (2003) también comprobaron este tipo de comportamiento de la PTH después del parto, ya que constaron una mayor concentración de esta hormona en los animales que consumían una dieta alcalinizante, estando las concentraciones de la misma inversamente relacionadas con las concentraciones de calcio iónico.

En ratas también se ha visto que la administración de dietas alcalinizantes (disminución del contenido en cloro o suplementación con  $\text{HCO}_3^-$ ) parece aumentar los niveles de PTH y de calcitriol como respuesta a la caída de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bushinsky *et al.*, 1989).

3. En este grupo englobamos grupos de investigadores que relacionaron la administración de la dieta aniónica con un aumento de la PTH y de la vitamina D. Abu Damir *et al.* (1991) trabajaron en corderos a los que administraron una dieta acidificante y otra alcalinizante, modificadas mediante la adición de sales iónicas. Estos autores encontraron que el grupo de corderos alimentado con la dieta aniónica presentaba una concentración de PTH significativamente mayor; respecto a la 1,25-dihidroxitamina D las concentraciones también eran mayores aunque las diferencias no eran estadísticamente significativas. Gafter *et al.* (1980) también encontraron un aumento de los niveles de calcitriol plasmático en ratas con acidosis metabólica crónica inducida por la administración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , que atribuyeron a la disminución de las concentraciones plasmáticas de fósforo, estos autores no realizaron mediciones de la PTH plasmática.
4. Otros investigadores como Lee *et al.* (1977), Saveur *et al.* (1977), Kawashima *et al.* (1982), Langman (1989) y Ro *et al.* (1990) afirmaron que en los individuos a los que se les induce una acidosis metabólica mediante la administración oral de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  presentan una disminución de la conversión de calcidiol en calcitriol probablemente

por una disminución de la actividad de la  $1\alpha$ -hidroxilasa renal. El incremento de los niveles de calcio iónico asociado a la reducción del pH sanguíneo parece ser el responsable de este hecho (Bushinsky *et al.*, 1985b).

En medicina humana, la gran parte de los trabajos coinciden en afirmar que en casos de acidosis metabólica crónica por adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  se produce un aumento del calcitriol a través de la estimulación de su ratio de producción y, concomitantemente, disminuyen las concentraciones de PTH (Krapf *et al.*, 1992; Mahlbacher *et al.*, 1999; Osther, 2006). El incremento del ratio de producción del calcitriol está asociado, al menos en parte, con la hipofosfatemia resultante de la disminución de la reabsorción tubular de fosfato. Por lo tanto la disminución de la PTH es consecuencia de la hipofosfatemia y del aumento del calcitriol sérico (Krapf *et al.*, 1992). Por otro lado, Maurer *et al.* (2003) estudiaron los efectos de la administración de una dieta acidificante y no encontraron diferencias estadísticamente significativas en lo que se refiere a estas dos hormonas, aunque sí detectaron un claro aumento del cortisol sanguíneo y de la excreción del tetrahydrocortisol, concluyendo que los efectos de las dietas acidificantes sobre el hueso pueden estar mediados, al menos en parte, por el aumento de la cortisolemia (Maurer *et al.*, 2003). Este último estudio apoya la teoría propuesta por Weber *et al.* (1976), en la cual tras no encontrar cambios ni en la 1,25-dihidroxitamina D ni en la PTH en personas a las que se les había inducido acidosis metabólica crónica respecto a los que formaban el grupo control, afirmaron que ninguna de estas hormonas media la resorción ósea que acompaña a la acidosis metabólica.

### **3.7.5.2. EFECTOS SOBRE EL METABOLISMO MINERAL: CALCIO, FÓSFORO Y MAGNESIO**

Debido a que en la primera parte de este trabajo ya hemos comentado en extenso los diversos factores que regulan las concentraciones de estos tres elementos en el organismo, en esta sección trataremos de exponer escuetamente los efectos directos de las variaciones del equilibrio ácido-básico y de las modificaciones de la DED sobre las concentraciones de estos tres minerales en suero y en orina.

#### **3.7.5.2.1. EFECTOS EN EL PLASMA**

Los trastornos ácido-básicos afectan de forma importante al metabolismo del calcio, fósforo y magnesio (Wiederkehr y Krapf, 2001).



De forma general debemos señalar que la mayoría de los estudios apuntan a que tanto la acidosis metabólica como la respiratoria aumentan la concentración de calcio iónico en sangre en diferentes especies (Oberleithner *et al.*, 1982; Szenci *et al.*, 1988; Bushinsky *et al.*, 1985b; Bushinsky *et al.*, 1992.); mientras que la presencia de una alcalosis metabólica, por el contrario, conduce a la disminución de los niveles de calcio iónico (Bushinsky *et al.*, 1989). Respecto al fósforo y al magnesio los resultados de los trabajos revisados son mucho más contradictorios. Así Gafter *et al.* (1980) constataron que en ratas con acidosis metabólica crónica el fósforo plasmático presentaba disminuciones estadísticamente significativas y las concentraciones de magnesio no cambiaban entre el grupo con acidosis y el grupo control (Gafter *et al.*, 1980; Kraut *et al.*, 1986). Roy *et al.* (1982) tampoco describen diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de magnesio en ratas paratiroidectomizadas tras provocarles disturbios ácido-básicos agudos.

En estudios crónicos se ha visto que en el hombre la presencia de acidosis metabólica conduce a la aparición de un aumento de las concentraciones sanguíneas de  $\text{Ca}^{2+}$  y a una disminución de las concentraciones de fosfato, estos resultados son similares a los que ya hemos comentado para otras especies (Krapf *et al.*, 1992; Wiederkehr y Krapf, 2001). En cuanto a la alcalinización de las dietas mediante la ingestión de  $\text{HCO}_3^-$ , Maurer *et al.* (2003) constataron una disminución del calcio iónico mientras que el fosfato y en el magnesio no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Centrándonos en el perro, en lo que respecta al calcio se han encontrado resultados similares a los que acabamos de citar, así se ha visto que la inducción de una acidosis metabólica aguda cursa con el aumento del calcio iónico plasmático (Oster *et al.*, 1982; López *et al.*, 2002; López *et al.*, 2004); mientras que la alcalosis metabólica aguda provoca una disminución de las concentraciones de este mineral (López *et al.*, 2003). En el caso de trastornos crónicos este hecho es más difícil de comprobar puesto que los mecanismos amortiguadores que entran en funcionamiento hacen que los cambios que se producen sean menos detectables. Por ejemplo, en el año 1983 Marone *et al.* trabajaron con tres grupos de perros: un grupo control, uno con acidosis metabólica y otro con alcalosis metabólica crónica, para estudiar el metabolismo del calcio, del fósforo y del magnesio. Estos investigadores sólo detectaron un incremento estadísticamente significativo de los niveles del calcio total en el grupo con alcalosis metabólica y en lo que respecta al calcio iónico, al fósforo y al magnesio no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos. Más acorde con lo comentado con anterioridad fueron los resultados obtenidos por Szenci *et al.* (1988), los

cuales encontraron que perros con acidosis metabólica crónica presentaban una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  significativamente mayor que los perros sanos, en cambio las concentraciones de calcio total no presentaban variaciones estadísticamente significativas.

Valores normales en perro	
Calcio	9-12 mg/dl (animales adultos)
Fosfato	3-6,5 mg/dl
Magnesio	1,8-2,5 mg/dl

**Tabla 20:** Valores normales en el perro adulto para el calcio, fosfato y magnesio (Nelson y Couto, 2000)

Dado que en perro no contamos con experiencias previas en lo que respecta a las variaciones de la DED de la dieta, revisaremos brevemente los resultados obtenidos en otras especies.

Trabajando en ganado porcino, la mayoría de los autores encontraron un aumento de las concentraciones de calcio ionizado conforme disminuían la DED de la ración (Patience y Chaplin, 1997; DeRouchey *et al.* 2003). En cuanto a las concentraciones de calcio total existen resultados más dispares, mientras que algunos autores no encuentran modificaciones de este parámetro con la variación de la DED como es el caso de Patience y Chaplin (1997), otros han constatado disminuciones significativas con el aumento de la diferencia electrolítica de la dieta. Existen trabajos más amplios que también han incluido el estudio de las concentraciones de fósforo y magnesio, por ejemplo, Budde y Crenshaw (2003) emplearon dietas con -35, 112 y 212 mEq/kg de DED, y observaron que las concentraciones de fósforo y magnesio presentaron una tendencia a la disminución conforme disminuía la DED de la ración, pero las diferencias no llegaron a ser significativas.

En lo que respecta a las aves de corral aunque se ha trabajado mucho con variaciones de la DED, no existen prácticamente ensayos en los que se hayan determinado las concentraciones de estos minerales plasmáticos. Una excepción la tenemos en los trabajos publicados en el año 2005 por los equipos investigadores de Moghaddam *et al.* y de Gezen *et al.*, los cuales midieron las concentraciones de calcio sérico en grupos de gallinas a las que administraba dietas con diferente DED, constatando que no existían diferencias significativas entre los grupos. Asimismo, Johnson y Karunajeewa (1985) no detectaron ningún efecto de la variación de la DED sobre el calcio, fósforo y magnesio plasmático en pollos.

En investigaciones llevadas a cabo en ovejas los resultados que se han encontrado con más frecuencia son: un aumento significativo de los niveles de calcio iónico plasmático en los animales que consumen dieta aniónica, mientras que los niveles de calcio total, fósforo y magnesio no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Abu Damir *et al.*, 1991; Espino, 2003; Espino *et al.*, 2003). Estos resultados coinciden con los hallazgos encontrados por la mayoría de los autores que trabajan en vacuno, donde son numerosos los estudios que reportan un aumento de la fracción de calcio biológicamente activa al administrar dietas aniónicas (Wang y Beede, 1992; Abu Damir *et al.*, 1994; Joyce *et al.*, 1997; Schonewille *et al.*, 1999; Roche *et al.*, 2005).

Siguiendo con el ganado vacuno y en relación a las variaciones en la concentración de fósforo al variar la DED, solamente decir que en algunos de los trabajos revisados hemos constatado la presencia de un incremento de la fosfatemia en vacas alimentadas con sales aniónicas (Block, 1984; Phillippo y Reid, 1994; Goff y Horst, 1998), pero en otros trabajos no se ha llegado a constatar el incremento de las concentraciones sanguíneas de este mineral asociado a este tipo de dietas (Wang y Beede, 1992; Van Mosel *et al.*, 1994; Fauchon *et al.*, 1995; Vagnoni y Oetzel, 1998).

A continuación exponemos las explicaciones fisiológicas aportadas por los diferentes autores en relación a los fenómenos que acabamos de relatar:

Según lo tratado hasta ahora, la mayoría de los estudios describen un aumento de los niveles de calcio iónico cuando consumen sales aniónicas, la explicación más sencilla de este hecho es que en casos de acidosis metabólica subclínica existe una competición entre los iones hidrógeno y el calcio por los puntos de unión a las proteínas plasmáticas. Por este motivo cuando se eleva la tasa de protones se favorece la disociación de la unión del calcio a proteínas, con el correspondiente aumento de los niveles de la fracción iónica de este mineral. Las proteínas plasmáticas suponen, como ya hemos visto, un sistema de amortiguación inmediato a las variaciones del equilibrio ácido-básico (Segura *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2004a). Ya en 1970 Moore examinó el efecto del pH sobre la concentración de calcio ionizado *in vitro* en sangre humana demostrando la existencia de cambios instantáneos y reversibles en función del pH. Dicho investigador constató un incremento lineal o de forma sigmoidal en la concentración de calcio iónico al disminuir el pH sanguíneo.

Con respecto a las modificaciones de las concentraciones plasmáticas de fósforo, cabría esperar un aumento de este elemento mediado por la disolución de los cristales de

hidroxiapatita tras la administración de dietas acidificantes, pero en estudios realizados en humanos y en roedores se ha hallado una marcada hiperfosfaturia asociada al consumo de dietas acidificantes (Brosnan y Brosnan, 1982; Krapf *et al.*, 1992; Gafter *et al.*, 1980).

En lo que concierne al magnesio, en principio lo esperable sería que este mineral presentase un comportamiento similar al calcio, es decir, que en casos de acidosis metabólica se produzca un aumento de las concentraciones de magnesio ionizado. En cambio Blumberg *et al.* (1998) han demostrado que, al menos en humana, el comportamiento no es este, sino que tras inducir una acidosis metabólica a través de la administración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no aparecen diferencias estadísticamente significativas ni en el magnesio total, ni en el ionizado.

### 3.7.5.2.2. EFECTOS EN LA ORINA

**Efectos en la calciuria:** A lo largo de las últimas décadas muchos investigadores han documentado la aparición de hipercalciuria asociada a estados de acidosis en muchas especies animales y en el hombre (Martin y Jones, 1961; Lemann *et al.*, 1967; Stacy y Wilson, 1970; Martin y Jones, 1961; Horst y Jorgensen, 1974; Sutton *et al.*, 1979; Marone *et al.*, 1983; Wong *et al.*, 1986; Lau *et al.*, 1987; Newell y Beauchene, 1987; Fredeen *et al.*, 1988a y b; Abu Damir *et al.*, 1991; Krapf *et al.*, 1992; Houillier *et al.*, 1996; Patience y Chaplin, 1997; Budde y Crenshaw, 2003; Maurer *et al.*, 2003; Ariceta *et al.*, 2004; Lina y Kuijpers, 2004; Kim y Park, 2005; Nijenhuis *et al.*, 2006; Osther, 2006). Aunque en algunas investigaciones la presencia de este aumento de la concentración de calcio en orina ha estado asociada con incrementos significativos del calcio iónico o del calcio total plasmático, como es el caso de los trabajos de Budde y Crenshaw (2003) y Osther (2006), existen muchos otros estudios en los que no se han detectado variaciones significativas de ninguna de las formas de este mineral en sangre (Lemann *et al.*, 1966; Abu Damir *et al.* 1991; Krapf *et al.*, 1992; Gezen *et al.*, 2005).

Como ya hemos dicho, en caso de acidosis crónica se produce movilización de calcio a partir del hueso bien a través de la disolución mineral directa (Bushinsky *et al.*, 1983; Bushinsky *et al.*, 1985a) o a través de la estimulación de la resorción ósea mediada por células (Krieger *et al.*, 1992). Por tanto, la hipercalciuria es resultado de un incremento en la carga de calcio filtrada y una disminución de su reabsorción (Battlle *et al.*, 1982; Wiederkehr y Krapf, 2001). Los mecanismos celulares últimos que participan en este proceso todavía no se conocen en profundidad, de lo que sí se tiene conocimiento es de que la reabsorción de calcio está

correlacionada con la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  a nivel del túbulo distal (Wiederkehr y Krapf, 2001).

En el caso de la alcalosis metabólica algunos estudios comprobaron que en hombre y en rata disminuye la excreción de calcio después de la administración de un álcali (Parfitt *et al.*, 1964; Beck y Webster, 1976). Marone *et al.* (1983) dieron un paso más cuando observaron que, en el perro, la alcalosis metabólica crónica incrementa la reabsorción tubular fraccional de calcio independientemente de la cantidad de calcio filtrada y de forma independiente a la PTH, puesto que ocurría tanto en perros normales como paratiroidectomizados.

Durante las últimas dos décadas el efecto de la PTH sobre el riñón en situaciones de acidosis metabólica ha sido muy discutido, existiendo dos teorías claramente enfrentadas:

- Los riñones de los animales que presentan acidosis metabólica crónica son incapaces de responder de forma adecuada a la PTH (Beck *et al.*, 1975; Sutton *et al.*, 1979; Beck, 1981; Bushinsky y Coe, 1981; Battle *et al.*, 1982; Marone *et al.*, 1983; Houillier *et al.*, 1996). Sutton *et al.* 1979 realizaron estudios empleando la técnica de micropuntura en perro y llegaron a la conclusión de que la acidosis metabólica crónica deteriora selectivamente la reabsorción tubular de calcio independientemente de los cambios que ocurran en la secreción de la hormona paratiroidea. Algunos autores justifican que esta ausencia de efecto se debe a una falta de producción de  $\text{AMP}_c$  dependiente de PTH, por carencias en la activación de la adenilato ciclasa renal dependiente de esta hormona (Beck *et al.*, 1975; Beck, 1981; Bellorin-Font *et al.*, 1985). De este modo, a pesar del exceso de PTH que existe en ciertos casos de acidosis metabólica crónica, es posible el desarrollo de hipercalcemia (Battle *et al.*, 1982). En 1996 Houillier *et al.* y en el 2006 Osther en estudios realizados en humana, además de observar que el efecto de la acidosis metabólica sobre la excreción renal de calcio y magnesio era independiente de la PTH, comprobaron que existía una relación clara entre el aumento de la excreción neta de ácido y de la eliminación de estos dos cationes. En resumen, que el efecto de la acidosis y, para algunos investigadores, de la alcalosis es independiente de PTH y dependiente, sobre todo, de la excreción neta de ácido (Marone *et al.*, 1983).
- Otro grupo de estudiosos que trabajaron en diferentes especies, afirman que los efectos fosfatúrico e hipocalciúrico de la PTH sobre el riñón no están deteriorados durante la acidosis metabólica (Kraut *et al.*, 1983; Wong *et al.*, 1985; Scott *et al.*,

1993). En un trabajo realizado en 1985 por Wong *et al.*, tanto en perros control como acidóticos paratiroidectomizados a los que administraron PTH exógena, comprobaron mediante técnicas de micropuntura que en el grupo acidótico estaban presentes los efectos renales de dicha hormona.

**Efectos en la fosfaturia:** En cuanto a la excreción de fosfato en orina, la mayoría de los investigadores coinciden en que estados de acidosis están relacionados con hiperfosfaturia (Martin y Jones, 1961; Lemann *et al.*, 1966; Lemann *et al.*, 1967; Krapf *et al.*, 1992; Blumberg, 1998; Maurer *et al.*, 2003; Lina y Kuijpers, 2004; Kim y Park, 2005; Osther, 2006), mientras que situaciones de alcalosis disminuyen la eliminación renal de este elemento (Koeppen y Staton, 2006). A pesar de que existen múltiples evidencias, contamos con trabajos que no han podido probar este aumento de la excreción urinaria de fósforo, por ejemplo, Martin y Jones (1971) administraron a seis sujetos de diferentes edades, peso y sexo una dieta control, una dieta enriquecida con cloruro amónico ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y una tercera dieta enriquecida con bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ) durante cinco días. Estos investigadores comprobaron que el grupo que consumía la dieta enriquecida en cloruro amónico, presentaba una excreción mayor de fósforo en orina pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Se cree que la dinámica de excreción del fósforo respecto al calcio durante la acidosis metabólica crónica es un poco diferente. Al parecer las pérdidas de fósforo comienzan inmediatamente tras la administración de la sustancia acidificante, mientras que las pérdidas de calcio se elevan progresivamente tras el comienzo de la administración y disminuyen del mismo modo tras la retirada de dicho agente (Lemann *et al.*, 1966).

**Efectos en la magnesuria:** Como ya hemos mencionado al principio de este apartado, estados de acidosis reducen la reabsorción de calcio a nivel de los túbulos renales y aumentan la calciúria, mientras que la alcalosis provoca el efecto contrario. Dado que la reabsorción tubular de magnesio comparte muchos mecanismos de transporte (Shareghi y Agus, 1982; Quamme, 1997) y de regulación (Ferment y Touitou, 1988) con el calcio, deberíamos esperar un efecto similar sobre el magnesio a nivel de los túbulos renales. De manera general, en estados de acidosis metabólica aguda y crónica la mayoría de los investigadores han verificado esta premisa (Martin y Jones, 1961; Wong *et al.*, 1986; Lau *et al.*, 1987; Shapiro *et al.*, 1987; Blumberg *et al.*, 1998; Ariceta *et al.*, 2004; Nijenhuis *et al.*, 2006); aunque este efecto no ha sido demostrado de forma universal (Martin y Jones, 1961; Gafter *et al.* 1980; Marone y Sutton, 1980; Roy *et al.*, 1982). Del mismo modo, está

documentado que durante estados de alcalosis metabólica aguda disminuye la excreción renal de magnesio (Wong *et al.*, 1986; Roy *et al.*, 1982; Levin y Winaver, 1989). Wong *et al.* en 1986 propusieron para justificar este hecho que la cantidad de bicarbonato presente en los túbulos renales podría tener un efecto directo sobre la reabsorción renal de magnesio a nivel del túbulo distal, aunque en realidad, son necesarios más estudios para clarificar el papel de bicarbonato en el manejo renal del magnesio.

A continuación resumimos los resultados obtenidos sobre la excreción de estos minerales en orina por los investigadores que han aplicado el concepto de diferencia electrolítica de la dieta en diferentes especies:

En porcino, Golz y Crenshaw (1991) encontraron que la excreción de calcio en orina tendía a aumentar a medida que se elevaban los niveles de cloro en la ración, mientras que la excreción urinaria de fosfato tendía a ser menor. Dichos investigadores también comprobaron que los animales alimentados con las dietas altas en cloro presentaban una menor excreción de  $\text{HPO}_4^{2-}$  mientras no había diferencias estadísticamente significativas en la eliminación de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  entre los grupos, por lo que concluyeron que en los animales que consumían las dietas enriquecidas en cloro se producía una disminución de las reservas de bases urinarias ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), estos resultados coinciden con los encontrados por Budde y Crenshaw (2003). Patience y Chaplin (1997) encontraron incrementos significativos en la excreción de calcio urinaria asociados a dietas acidogénicas, mientras que no detectaron variaciones en la excreción de fosfato y magnesio.

En ovejas, Abu Damir *et al.* (1991) y MacLeay *et al.* (2004) detectaron un aumento significativo tanto de la excreción fraccional tanto de calcio como de fósforo en los animales que recibieron dieta acidificante.

### **3.7.6. OTROS EFECTOS**

En este epígrafe englobamos una serie de parámetros metabólicos que no se pueden introducir en ninguno de los grupos anteriores y que hasta la fecha han sido estudiados sólo de forma ocasional en relación a este tema.

#### **3.7.6.1. GLUCOSA**

Borges *et al.* (2003) trabajaron administrando a broilers 4 dietas de diferente DED en dos ambientes, un ambiente termoneutro y un ambiente con estrés térmico. No encontraron diferencias claras en las concentraciones de glucosa entre los grupos criados en ambientes

termoneutros con distintas DED, pero sí entre estos animales y los que permanecieron en estrés térmico ya que estos últimos presentaban concentraciones de este parámetro significativamente mayores. Estos resultados los atribuyeron a que la concentración sanguínea de glucosa puede aumentar como respuesta directa a la elevación transitoria de la secreción de adrenalina, noradrenalina y glucocorticoides, que aparecen como consecuencia fisiológica de una situación de estrés. De hecho, en medicina humana, Sicuro *et al.* (1998) han encontrado que la acidosis metabólica aumenta significativamente la actividad glucocorticoide, basándose en los ratios de excreción diaria de tetrahydrocortisona y cortisol. Espino *et al.* (2005) observaron, del mismo modo, que la administración de dietas aniónicas en ovejas durante el periodo en torno al parto inducía la aparición de acidosis metabólica y de un hipercortisolismo moderado asociado a la ingesta de este tipo de ración.

Gezen *et al.* (2005) trabajaron con 4 dietas de diferente DED (80, 170, 256 y 330 mEq/kg) en gallinas ponedoras durante 8 semanas y no encontraron diferencias estadísticamente significativas en lo que a las concentraciones de glucosa se refiere, estos resultados están de acuerdo con los encontrados con Boukila *et al.* (1995) en ovejas.

### **3.7.6.2. PROTEÍNAS TOTALES Y ALBÚMINA**

Las proteínas, principalmente la albúmina (Alb), influyen en el balance ácido-básico actuando como ácidos débiles. De tal manera que disminuciones en la concentración de proteínas o albúmina conducen a la aparición de alcalosis, mientras que incrementos de las mismas dan lugar a acidosis (Russell *et al.*, 1996). En personas críticamente enfermas se ha visto que la hipoproteinemia se asocia a la aparición de una alcalosis metabólica, en estos individuos se verificó que una disminución de la concentración de albúmina sérica de 1 g/100 ml causaba un aumento en el exceso de base estándar de +3,7 mEq/L (McAuliffe *et al.*, 1986).

### **3.7.6.3. EFECTOS DE LA DED SOBRE EL HEMATOCRITO Y LA HEMOGLOBINA**

Otro punto interesante que podemos incluir en este epígrafe es el efecto que puede provocar la modificación de la DED sobre la concentración de hemoglobina sanguínea y, por extensión, sobre el contenido en oxígeno de la sangre. En lo que respecta a la influencia sobre estos parámetros pocos son los autores que se han ocupado de este tema y los resultados presentados por los mismos son discordantes.

En porcino, Dersjant-Li *et al.* (2002) encontraron que la disminución de la DED provocaba la disminución del contenido de hemoglobina sanguíneo en las horas después de la ingesta.



Estos resultados coinciden con las observaciones de Patience y Wolynetz (1990), quienes constataron una disminución lineal en el hematocrito cuando disminuían la DED de 248 a -176 mEq/kg. Teniendo en cuenta que la mayor parte del oxígeno presente en la sangre se encuentra unido a la hemoglobina (en torno al 97%), la administración de dietas ácidas reduciría el aporte de oxígeno a los tejidos, lo que podría explicar de forma parcial la disminución de la ingesta que aparece con motivo de la disminución de la DED en los animales (Yen *et al.*, 1981; Patience *et al.*, 1987; Park *et al.*, 1994). Boukila *et al.* (1995), trabajando con ovejas sólo encontraron pequeñas variaciones en el hematocrito antes de la administración diaria de dos dietas acidificantes, los autores atribuyeron esta variación a diferencias en el estado de hidratación de los animales, pues una vez que comían y bebían estas variaciones dejaban de aparecer.

#### **3.7.6.4. EFECTOS DE LA DED SOBRE LA UREA PLASMÁTICA Y LA CREATININA URINARIA**

DeRouchey *et al.* (2003) trabajaron con cerdas lactantes a las que administraron 5 dietas con diferente DED (0, 100, 200, 350 y 500 mEq/L) y no encontraron diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros, de modo que sus resultados no mostraron evidencias de que las diferencias electrolíticas de la dieta empleadas afecten al estado catabólico de dichos animales.

Aunque estos dos parámetros fueron empleados por DeRouchey *et al.* (2003) como indicadores del catabolismo excesivo de masa corporal magra, hay que tener en cuenta que existen diversos trabajos de investigación que han asociado la administración de sustancias acidificantes con una disminución de la ureagénesis hepática (Kashiwagura *et al.*, 1984; Patience y Chaplin, 1997), aunque parece que este efecto se debe más al contenido en cloro de la ración que a la DED de la dieta (Coffey *et al.*, 1985; Dersjant-Li *et al.*, 2001a).



## *Material y Métodos*



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL VIVO EXPERIMENTAL

Para realizar el presente trabajo hemos empleado perros beagle machos adultos con una edad media de 3 años ( $3 \pm 0,5$  años) y un peso promedio de 14,8 kg ( $14,8 \pm 3,19$ ). Con el fin de estudiar los efectos de las diferentes dietas constituimos 3 grupos de 7 ejemplares cada uno. Todos los perros procedían de un establecimiento homologado para la cría de animales de experimentación a la edad de 5 meses y fueron mantenidos posteriormente en nuestro centro hasta la realización de este estudio experimental.

La primera parte de la fase experimental se realizó en base a la normativa vigente en aquel momento que era la directiva 86/609/CEE del Consejo, de 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproximación de disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Esta fue transpuesta al ordenamiento jurídico español por medio del Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo.

El 10 de octubre de 2005 se publicó el RD 1201/2005 sobre la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, con el fin de adaptar la normativa anterior incluyendo nuevas disposiciones y derogando otras. El objeto principal de este Real Decreto es establecer las normas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Su finalidad general es asegurar dicha protección y, en particular, que a los animales utilizados se les concedan los cuidados adecuados; que no se les cause innecesariamente dolor, sufrimiento, angustia o lesiones prolongadas; que se evite toda duplicación inútil de procedimientos y que el número de animales utilizados en los procedimientos se reduzca al mínimo, aplicando en lo posible métodos alternativos.

Durante el periodo de estancia en el HCV Rof Codina los perros recibieron las vacunas anuales y la desparasitación trimestral pertinente. Antes de la introducción en el estudio a todos los animales se les realizó una exploración clínica detallada y un estudio bioquímico y urinario básico, donde se confirmó su estado de salud.

## 4.2. ALIMENTACIÓN EXPERIMENTAL

En el ensayo pretendemos estudiar y comparar los efectos que ocasionan el consumo de tres dietas con diferente DED en los perros, con este fin hemos empleado una dieta control (pienso comercial de alta gama), una dieta aniónica (dieta control más aniones) y una catiónica (dieta control más cationes).

Los animales fueron alimentados siempre a las 11:00 de la mañana, administrando en cada uno de los grupos una dieta diferente, durante un periodo de 27 días. La totalidad de este estudio fue realizada durante el otoño-invierno con el fin de reducir al máximo posibles variaciones estacionales.

La dieta control estuvo constituida por un pienso comercial de alta gama y la cantidad administrada a cada animal fue calculada siguiendo las recomendaciones del fabricante de acuerdo con el peso de cada animal.

El pienso estaba compuesto por los siguientes ingredientes: maíz, carne deshidratada, harina de maíz, grasas animales, hígado de ave, pulpa de remolacha, levaduras, aceite de soja, aceite de pescado, minerales, L-tirosina, polifosfato de sodio, hidrolizado de levaduras, huevo deshidratado.

NUTRIENTE	RESULTADO	UNIDADES
Humedad	9,98	%
Cenizas	5,65	%
Proteína bruta	25,3	%
Fibra bruta	1,5	%
Grasa	14	%
Fósforo	0,76	%
Sodio	3449	ppm
Potasio	6914	ppm
Calcio	10836	ppm
Magnesio	1002	ppm
Ión Cloruro	6912	ppm
Ión Nitrato	887	ppm
Ión Nitrito	0	ppm
Ión Sulfato	1179	ppm

**Tabla 21:** Composición química de la dieta control

La composición química se determinó a través del laboratorio Trouw Nutrition España (Madrid) empleando los siguientes métodos analíticos: la humedad mediante gravimetría en estufa a 103°C; las cenizas mediante gravimetría en mufla a 500°C; la proteína bruta por el método Dumas; la fibra bruta por gravimetría Ankon; la grasa por hidrólisis ácida y método Soxhlet; el fósforo por colorimetría y, finalmente, el sodio, potasio, calcio, magnesio, ión cloruro, ión nitrato, ión nitrito e ión sulfato por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La DED fue calculada utilizando la ecuación propuesta por Mongin (1981) [ $DED = Na^+ + K^+ - Cl^-$  en mEq/kg de MS].

Tanto la dieta aniónica como la catiónica se obtuvieron a partir de modificaciones de la dieta control mediante la suplementación con sales. De este modo, la dieta acidificante fue suplementada con 0,7 g de  $ClNH_4$  por cada 100 g de materia seca con el fin de disminuir la DED de la ración a 0 mEq/Kg de MS, mientras que la dieta alcalinizante se obtuvo suplementando la ración con  $K_2CO_3$  a razón de 0,91 g por cada 100 g de MS, aumentando de este modo su DED hasta 264 mEq/kg.

En base a la DED hemos designado las tres dietas de la siguiente forma:

- Dieta control: DED: 132,1 mEq/kg MS.
- Dieta aniónica: DED: 0 mEq/kg MS.
- Dieta catiónica: DED: 264 mEq/kg MS.

La composición de los electrolitos para cada una de las tres dietas empleadas la expresamos de forma resumida en la siguiente tabla:

	ACIDOGÉNICA	CONTROL	ALCALINOGENICA
<b>Sodio</b>	0,34%	0,34%	0,34%
<b>Potasio</b>	0,69%	0,69%	1,21%
<b>Cloro</b>	1,14%	0,69%	0,69%

**Tabla 22:** Composición electrolítica de las 3 dietas empleadas

### 4.3. PROTOCOLO DE RECOGIDA DE MUESTRAS

Las muestras fueron recogidas dos veces por semana (martes y viernes). Las dietas siempre se comenzaban a dar en domingo para que la primera toma de muestras tuviera lugar 48 horas después de haber comenzado con la administración de la ración.

Los muestreos fueron realizados siempre en ayunas y a la misma hora (entre las 9:00 y las 11:00) para reducir al máximo las posibles fluctuaciones circadianas de los diferentes parámetros.

En la siguiente tabla exponemos el protocolo de toma de muestras a las que fueron sometidos los animales durante el estudio:

GRUPO CONTROL/GRUPO DIETA ANIÓNICA/GRUPO DIETA CATIÓNICA				
SEMANA	DÍA	S. ARTERIAL	S. VENOSA	ORINA
Semana 1	Día 3	X	X	X
	Día 6	X	X	X
Semana 2	Día 10	X	X	X
	Día 13	X	X	X
Semana 3	Día 17	X	X	X
	Día 20	X	X	X
Semana 4	Día 24	X	X	X
	Día 27	X	X	X

**Tabla 23:** Distribución de los muestreos

#### 4.3.1. RECOGIDA DE SANGRE ARTERIAL, VENOSA Y DE ORINA

La sangre venosa fue extraída de la vena yugular con la ayuda de una jeringuilla de 10 ml y una aguja de 20 G, posteriormente depositamos 5 ml en un tubo de vidrio sin anticoagulante y 2 ml en un tubo con 34 UI de heparina de litio con el fin de mantener la sangre entera sin coagular. En el caso del suero, los tubos se mantuvieron 30 minutos en reposo y seguidamente fueron centrifugados a 3000 rpm (1520 g) durante 15 minutos. Para la obtención del plasma, la sangre heparinizada se conservó a 4°C hasta su posterior centrifugación en el laboratorio, la cual se realizó a 3000 rpm (1520 g) y a 4°C durante 20 minutos.



Posteriormente guardamos varias alícuotas de 1 cm<sup>3</sup> de suero y una de plasma en tubos Eppendorf, que se identificaron debidamente y se mantuvieron almacenados a una temperatura entre -20 y -30 °C hasta el momento de realizar las diferentes determinaciones laboratoriales.

Para la obtención de sangre arterial empleamos una jeringuilla específica para este tipo de extracciones (Preset<sup>TM</sup>, BD Diagnostics, Plymouth, Reino Unido) previamente heparinizada por el fabricante (Ca<sup>2+</sup> LH 80UI) y que cuenta con una aguja de 22 G para la punción percutánea de la arteria femoral. Intentamos evitar en todo momento la formación de burbujas de aire. Después de la extracción, sellamos las jeringuillas inmediatamente para evitar el intercambio con el medio externo, de forma inmediata procedimos a su análisis en el gasómetro.

La recogida de orina se realizó mediante cistocentesis ecoguiada empleando una jeringuilla convencional de 5 ml y una aguja de 21 G y 40 mm que nos permitió alcanzar con facilidad la vejiga de la orina.

#### **4.4. PARÁMETROS MEDIDOS Y METODOLOGÍA EMPLEADA**

##### **4.4.1. PARÁMETROS PARA VALORAR EL ESTADO ÁCIDO-BÁSICO SANGUÍNEO**

Los niveles de pH, presión parcial de anhídrido carbónico (pCO<sub>2</sub>), concentración total de anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>t), bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y exceso de bases (EB) fueron medidos empleando el analizador portátil i-STAT<sup>®</sup> (Sensor Devices, Waukesha, EEUU). La efectividad y precisión de este equipo ha sido bien probada en medicina humana desde hace tiempo debido a su presencia en un número elevado de unidades de cuidados intensivos y, posteriormente, se evaluó de forma positiva para su aplicación en medicina veterinaria (Grosenbaugh *et al.*, 1998; Looney *et al.*, 1998) y, concretamente, en perros (Verwaerde *et al.*, 2002).

El sistema i-STAT<sup>®</sup> está constituido por un analizador portátil y diferentes sensores que están incluidos en “cartuchos”, junto a componentes microfluídicos y la solución de calibrado correspondiente. De los múltiples “cartuchos” disponibles en el mercado, para nuestro trabajo seleccionamos el i-STAT<sup>EG8+</sup><sup>®</sup> que dispone de los elementos necesarios para la cuantificación de todos los parámetros citados anteriormente en sangre entera heparinizada.

Además, este “cartucho” mide las concentraciones de sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), calcio iónico ( $\text{iCa}^{2+}$ ) y los valores de hematocrito (Hct) y hemoglobina (Hb).

Para iniciar el análisis, la sangre se introduce en el “cartucho” (de un solo uso) directamente con la jeringuilla, para reducir al mínimo el contacto de la muestra con el aire. El control de calidad de cada análisis comenzaba con la valoración de la solución de calibrado presente en cada “cartucho” y que ajustaba los diferentes coeficientes para cubrir los estándares del analizador que fue regularmente renovado. Previamente a la realización del análisis de cada muestra se corrigió la temperatura en la memoria del equipo de los  $37^\circ\text{C}$ , a la que está estandarizado, a la temperatura rectal de cada animal, con el propósito de corregir los valores de las presiones parciales de los gases.

#### 4.4.1.1. PARÁMETROS MEDIDOS

##### ***PH Y PRESIÓN PARCIAL DE ANHÍDRIDO CARBÓNICO ( $\text{PCO}_2$ )***

El analizador determina los niveles de estos dos parámetros por potenciometría directa. El principio de esta técnica se basa en la cuantificación de la diferencia de potencial en un circuito entre un electrodo de medida y uno de referencia. El sistema de medida es calibrado mediante la introducción de una solución con niveles conocidos de cada parámetro. En el “cartucho” utilizado en nuestro estudio dicha solución tenía un pH de 7,43 y una  $\text{pCO}_2$  de 30 mmHg.

#### 4.4.1.2. PARÁMETROS CALCULADOS

A partir de los valores de pH y  $\text{pCO}_2$ , el analizador calcula tres de los parámetros más comúnmente utilizados en el análisis tradicional del estado ácido-básico ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_2\text{t}$  y EB) empleando las siguientes ecuaciones:

$$\log \text{HCO}_3^- = \text{pH} + \log \text{pCO}_2 - 7,608$$

$$\text{CO}_2\text{t} = \text{HCO}_3^- + 0,03 \times \text{pCO}_2$$

$$\text{EB} = \text{HCO}_3^- - 24,8 + 16,2 \times (\text{pH} - 7,4)$$

El *anion GAP* (AG) se obtuvo a partir de la diferencia entre los cationes y aniones más abundantes en suero. Se escogió el AG incluyendo al potasio, aplicando la fórmula que se describe a continuación:

$$AG = (Na^+ + K^+) - (Cl^- + HCO_3^-)$$

Para el análisis cuantitativo del equilibrio ácido-básico hemos empleado las siguientes fórmulas extrapoladas de los estudios de Leith (1991) y de Morais (1992).

**DIF:** la diferencia de iones fuertes se determinó realizando los siguientes cálculos

$$DIF_{aproximada} = [Na^+_{media normal}] - [Cl^-_{corregido}]$$

$$Cl^-_{corregido} = Cl^-_{paciente} \times (Na^+_{media normal} / Na^+_{paciente})$$

Todas las concentraciones han de expresarse en mEq/L

Cambios en el agua libre:

$$\Delta \text{ Agua libre} = Z (Na^+_{paciente} - Na^+_{media normal})$$

$Z = 0,25$  en el caso del perro (de Morais, 1992)

Cambios en el  $Cl^-_{corregido}$ :

$$\Delta Cl^- = (Cl^-_{medio normal} - Cl^-_{corregido})$$

Variaciones en los aniones no medibles:

$$\Delta \text{ Aniones no medibles} = EB - (\Delta \text{ Agua libre} + \Delta Cl^- + \Delta \text{ Albúmina} + \Delta \text{ Fósforo})$$

**A<sub>TOT</sub>:** como ya hemos visto los principales factores que afectan a esta variable con las variaciones en la albúmina y en el fósforo, de modo que:

$$\Delta \text{ Albúmina} = 3,7 (Albúmina_{media normal} (g/dl) - Albúmina_{paciente} (g/dl)) = mEq/L$$

$$\Delta \text{ Fósforo} = 1,8 (\Delta \text{ Fósforo}_{ajustado} (mmol/L)) = mEq/L$$

$$\Delta \text{ Fósforo}_{ajustado} = (Fósforo_{medio normal} (mg/dl) - Fósforo_{paciente} (mg/dl)) = mg/dl$$

$$0,3229 (Fósforo_{ajustado} (mg/dl)) = Fósforo_{ajustado} (mmol/L)$$

## **4.4.2. PARÁMETROS PARA VALORAR EL ESTADO ÁCIDO-BÁSICO EN ORINA**

### **4.4.2.1. PH URINARIO**

El pH urinario se midió inmediatamente tras la extracción de orina mediante el empleo de un pHmetro (microPH 2001<sup>®</sup>, Crison, Barcelona, España), las calibraciones del mismo se hicieron siguiendo rigurosamente las recomendaciones del fabricante. El valor de pH empleado en nuestro estudio fue la media aritmética de tres mediciones consecutivas.

## **4.4.3. MINERALES E IONES ESTUDIADOS**

### **SODIO, POTASIO Y CALCIO IÓNICO**

Las concentraciones sanguíneas de estos tres electrolitos se midieron por potenciometría electródica ionoselectiva en sangre arterial. Para ello, de nuevo se seleccionó el sistema i-STAT<sup>®</sup> (Sensor Devices, Waukesha, EEUU) y el “cartucho” i-STAT<sup>EG8+</sup><sup>®</sup> (Sensor Devices, Waukesha, EEUU). Al igual que para la determinación de pH y pCO<sub>2</sub>, el principio de esta técnica se basa en la cuantificación de la diferencia de potencial en un circuito, entre un electrodo de medida y otro de referencia, generada al interactuar el electrolito con su electrodo específico. En este caso, la solución de calibrado contenía 140 mEq/L de sodio, 4 mEq/L de potasio y 1,25 mmol/L de calcio iónico. El equipo aplica la ecuación de Nernts para relacionar el potencial generado por el electrolito con su concentración. El empleo del análisis de muestras no diluidas (métodos directos) es un método seguro y preciso para determinar la concentración de iones libres (Durst y Siggard-Anderson, 1994).

### **CLORO**

La determinación de la concentración de iones cloruro se realizó mediante una técnica de colorimetría basada en la reacción del cloro de la muestra con una solución que contiene tiocianato mercúrico, con el que forma un complejo indisociable de cloruro mercúrico e iones tiocianato libres. Estos iones de tiocianato interaccionan con el hierro para formar un complejo de color rojo, la absorbancia máxima se produce a 460 nm. Siendo la absorbancia a 460 nm directamente proporcional a la concentración de cloruro de la muestra.

Para el análisis de las muestras se empleó un analizador automático de bioquímica líquida Falcor 350<sup>®</sup> (Biotechnica Instruments spA, Roma, Italia). El reactivo para la determinación del ión cloruro fue el denominado Falcorgent Cloruro<sup>®</sup> (A. Menarini Diagnostics, Florencia, Italia).

## **CALCIO TOTAL**

Para la determinación del calcio total en las muestras se empleó un test fotométrico basado en el uso de cresolftaleína coplexona (CPC). La CPC reacciona con los iones de calcio en un medio alcalino dando como resultado un color rojo violáceo. La interferencia del magnesio se elimina añadiendo 8-hidroxiquinolina. La absorbancia a 570 nm es directamente proporcional a la concentración de calcio de la muestra.

Para el análisis de las muestras se empleó un analizador automático de bioquímica líquida Falcor 350<sup>®</sup> (Biotechnica Instruments spA, Roma, Italia). El reactivo para la determinación del calcio total de la muestra se empleó el reactivo Falcorgent Calcium CPC<sup>®</sup> (A. Menarini Diagnostics, Florencia, Italia).

## **FÓSFORO**

En medios ácidos y en presencia de un tensoactivo adecuado, el fósforo inorgánico reacciona con amonio molibdato, dando origen a un complejo fosfomolibdico con absorción máxima a 340 nm. La absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la concentración de fósforo inorgánico de la muestra.

Para desarrollar esta técnica empleamos el analizador automático de bioquímica líquida Falcor 350<sup>®</sup> (Biotechnica Instruments spA, Roma, Italia). El reactivo utilizado para la realización de las determinaciones fue Falcogent Phosphorus<sup>®</sup> (A. Menarini Diagnostics, Florencia, Italia).

## **MAGNESIO**

Los iones de magnesio forman un complejo de color púrpura con azul de xilidil en solución alcalina. La presencia de GEDTA (ácido glicoeterdiamino tetracético) atrapa los iones de calcio en un complejo quelante previniendo su interferencia, la reacción es específica. La absorbancia se lee a 520 nm. La intensidad del color púrpura a 520 nm es directamente proporcional a la concentración de magnesio en la muestra.

Para desarrollar esta técnica empleamos el analizador automático de bioquímica líquida Falcor 350<sup>®</sup> (Biotechnica Instruments spA, Roma, Italia). El reactivo empleado para la realización de esta técnica fue el Falcorgent Magnesium<sup>®</sup> (A. Menarini Diagnostics, Florencia, Italia).

#### **4.4.4. OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS:**

##### **4.4.4.1. EN PLASMA Y SANGRE ENTERA: GLUCOSA, PROTEÍNAS TOTALES, ALBÚMINA, UREA Y CREATININA**

###### **GLUCOSA**

La concentración de glucosa fue medida empleando el analizador portátil i-STAT<sup>®</sup> (Sensor Devices, Waukesha, EEUU), que como ya hemos mencionado, su efectividad y precisión ha sido evaluada de forma positiva para su aplicación en medicina veterinaria.

El citado aparato emplea un método amperométrico para la determinación de este parámetro a partir de una muestra de sangre entera. La oxidación de la glucosa, catalizada mediante la enzima glucosa oxidasa, produce peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El peróxido de hidrógeno liberado se oxida en el electrodo para producir una corriente que es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

###### **PROTEÍNAS TOTALES**

La concentración de proteínas totales se determinó en plasma empleando el método biuret. En medio alcalino, los iones de Cu reaccionan con enlaces peptídicos de la proteína y forman un complejo de proteína y cobre de color rojo oscuro, que alcanza su máxima absorción a 550 nm. La absorbancia a 550 nm es directamente proporcional a la concentración de proteína en la muestra.

Para desarrollar esta técnica empleamos el analizador automático de bioquímica líquida Falcor 350<sup>®</sup> (Biotechnica Instruments spA, Roma, Italia). El reactivo empleado para la realización de esta técnica fue el Falcorgent Total Protein<sup>®</sup> (A. Menarini Diagnostics, Florencia, Italia).

###### **ALBÚMINA**

La concentración de albúmina se determinó a partir de plasma. El método de determinación se basa en que la albúmina plasmática se combina con verde de bromocresol para formar un complejo de color que se mide a 620 nm. La absorbancia a 620 nm es directamente proporcional a la concentración de albúmina en la muestra.

Para desarrollar esta técnica empleamos el analizador automático de bioquímica líquida Falcor 350<sup>®</sup> (Biotechnica Instruments spA, Roma, Italia). El reactivo empleado para la realización de esta técnica fue el Falcorgent Albumin<sup>®</sup> (A. Menarini Diagnostics, Florencia, Italia).

### **CREATININA**

La creatinina se valoró a partir de muestras de plasma. La determinación se realizó mediante un examen sin desproteinización según el método Jaffé. La creatinina forma un complejo de color anaranjado rojizo en una solución de picrato alcalino. La diferencia de absorción medida a 510 nm en tiempos establecidos durante la conversión es proporcional a la concentración de creatinina de la muestra.

Para desarrollar esta técnica empleamos el analizador automático de bioquímica líquida Falcor 350<sup>®</sup> (Biotechnica Instruments spA, Roma, Italia). El reactivo empleado para la realización de esta técnica fue el Falcorgent Creatinine<sup>®</sup> (A. Menarini Diagnostics, Florencia, Italia).

### **UREA**

La concentración de urea se determinó a partir de plasma. La ureasa hidroliza urea en amoníaco y dióxido de carbono. La glutamato-deshidrogenasa (GLDH) cataliza la reacción de amoníaco con 2-oxoglutarato y oxida NADH. La disminución de la absorbancia de NADH, medida a 340 nm es proporcional a la urea presente en la muestra.

Para desarrollar esta técnica empleamos el analizador automático de bioquímica líquida Falcor 350<sup>®</sup> (Biotechnica Instruments spA, Roma, Italia). El reactivo empleado para la realización de esta técnica fue el Falcorgent Urea<sup>®</sup> (A. Menarini Diagnostics, Florencia, Italia).

## **4.4.5. HEMATOLOGÍA (HEMATOCRITO, HEMOGLOBINA)**

### **HEMATOCRITO (HCT)**

La conductimetría es la técnica de la que dispone el analizador i-STAT<sup>®</sup> (Sensor Devices, Waukesha, EEUU) para la cuantificación del valor hematocrito. Basándose en el principio de Coulter, que establece que la conductividad de las células sanguíneas debe ser más baja que la de la solución salina en la que están suspendidas, la sangre es forzada a circular entre dos electrodos entre los que existe una corriente eléctrica constante. Cuando pasa una célula

aumenta la resistencia y se reduce la conductividad. La medida de la conductividad está relacionada inversamente con el Hct. En la medición del hematocrito es donde este analizador presenta un error importante y sus valores pueden estar hasta 4 ó 5 puntos por debajo de los obtenidos con un microhematocrito (Grosenbaugh *et al.*, 1998).

## HEMOGLOBINA

Referente a la hemoglobina, el “cartucho” i-STAT <sup>EG8+</sup>®, la incluye dentro de sus determinaciones, si bien no hace una medición directa de esta molécula sino que calcula su concentración a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Hb} = \text{Hct (fracción decimal)} \times 34$$

Por el hecho de tratarse de un parámetro calculado, la determinación de la hemoglobina presenta el mismo error que ya hemos mencionado para el caso del hematocrito.

### 4.4.6. CORTISOL SÉRICO

El cortisol de las muestras ha sido medido en el analizador de inmunoanálisis Immulite 2000® (Siemens, Diagnostic Products Corp., California, EEUU).

El Cortisol IMMULITE® (DPD, Dipesa, Madrid, España) es un enzimoimmunoanálisis quimioluminiscente competitivo en fase sólida. La fase sólida es una bola de poliestireno recubierta de un anticuerpo policlonal específico para el cortisol. El cortisol de la muestra compite con una molécula de cortisol marcada con fosfatasa alcalina por los sitios de unión del anticuerpo de la bola. El sustrato quimioluminiscente usado para la reacción enzimática es un éster fosfato de adamantil dioxetano (PPD).

El ensayo puede detectar las concentraciones de cortisol en un rango de 0,6 a 50 µg/dl con una sensibilidad analítica de 0,2 µg/dl. Los coeficientes de variación inter e intra-ensayo en perros, fueron de 6,8% y 5,2% respectivamente. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Este método de determinación ha sido previamente validado para su empleo en perros por Reimers *et al.* (1996) y por Singh *et al.* (1997).



#### 4.4.7. MARCADORES ÓSEOS (FAO; TCTI)

##### FOSFATASA ALCALINA DE ORIGEN ÓSEO (FAO)

Las concentraciones séricas de fosfatasa alcalina ósea (FAO) se determinaron mediante un ELISA comercializado para humana (Alkphase-B<sup>®</sup>, Metra Biosystems, Inc., California, EEUU), tratándose de un inmunoanálisis en formato de tira de microtitulación en el que se utiliza un anticuerpo monoclonal anti-FAO. El anticuerpo se presenta unido a los pocillos presentes en las tiras del análisis, en estos pocillos se añade la muestra problema (20 µl de suero y 125 µl de tampón de ensayo), esta mezcla se incuba durante 3 horas. Después de lavar las placas se detecta la actividad enzimática de la FAO que ha permanecido unida a los pocillos mediante un sustrato de fosfato de p-nitrofenol (pNPP, 150 µl). Posteriormente, mediante espectrofotometría se detectan las absorbancias que son transformadas en concentraciones a partir del cálculo de una curva estándar. El ensayo puede detectar las concentraciones de FAO humana en un rango de 0 a 140 U/L (1 U representa 1 µmol de pNPP hidrolizado por minuto a 25 °C en un tampón de 2-amino-2-metil-1-propanol) con una sensibilidad de 0,7 U/L. Los coeficientes de variación inter e intra-ensayo en perros, fueron de 5,6 y 3,5% respectivamente. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

La lectura de las placas se realizó en el fotómetro de lectura automática Titerkek Multiskan Plus MK II<sup>®</sup> (Labsystems, Helsinki, Finlandia) a 405 nm en los 15 minutos siguientes a la adición de la solución de parada.

Este método de ensayo ya ha sido empleado por otros investigadores en el perro como, por ejemplo, Ladlow *et al.* 2002, Breur *et al.* 2004 y Lacoste *et al.* 2006.

##### TELOPÉPTIDO CARBOXITERMINAL DE COLÁGENO TIPO I (TCTI)

El telopéptido carboxiterminal de colágeno tipo I fue medido con un kit de radioinmunoensayo (RIA) (UniQ ICTP<sup>®5</sup>, Orion Diagnostica, Espoo, Finland) validado en perro por Schoenmakers *et al.* (2000). Este kit de RIA está basado en una técnica de radioinmunoensayo competitiva. Una cantidad conocida de TCTI marcado y una cantidad desconocida de TCTI no marcado en una misma muestra compiten por una cantidad limitada de anticuerpo anti-TCTI de conejo que presenta sitios de unión de alta afinidad, la cantidad de TCTI marcada en el tubo de muestra es inversamente proporcional a la cantidad de TCTI de la muestra. Los coeficientes

---

<sup>5</sup> TCTP: es la abreviatura inglesa que se corresponde con TCTI.

de variación inter e intraensayo fueron 5,7% y 4,9% a 6,1 µg/L y 4,1% y 4,7% a 32 µg/L, respectivamente, con una sensibilidad de 0,7 µg/L (Schoenmakers *et al.*, 2000).

Para la medición de la radiactividad se empleó el contador gamma Wallac Wizard 1470<sup>®</sup> automatic counter (Perkin Elmer, Boston, EEUU) de la instalación radiactiva de la Facultad de Veterinaria de Lugo (IRA 2108).

#### **4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Para el procesado estadístico de los resultados empleamos el programa informático SPSS 14.0.2 para Windows (SPSS, Inc. Chicago, EEUU) licencia concedida a la Universidad de Santiago de Compostela.

Seleccionamos el análisis de varianza múltiple de dos vías para evaluar los efectos principales de las variables independientes “tipo de dieta” y “día de muestreo” y la posible interacción entre las mismas, para cada uno de los parámetros evaluados (Camacho, 2000).

Cuando se detectaron diferencias significativas, para realizar las comparaciones múltiples entre grupos se eligió la prueba de Tukey, valorando previamente la homogeneidad de las varianzas con el estadístico de Levene.

Resultados



## 5. RESULTADOS

Los resultados que hemos obtenido en la presente memoria de tesis doctoral los representaremos ordenados y esquematizados en forma de tablas y gráficas, además, con el fin de facilitar su comprensión los organizaremos en distintos subapartados:

- 5.1. Efecto de las dietas en el estado ácido-base.
- 5.2. Efecto de las dietas sobre los minerales plasmáticos.
- 5.3. Efecto de las dietas sobre otros parámetros hemáticos.
- 5.4. Efecto de las dietas sobre otros parámetros bioquímicos.
- 5.5. Efecto de las dietas sobre el cortisol sérico.
- 5.6. Efecto de las dietas sobre los marcadores de remodelación ósea.

### 5.1. EFECTOS DE LAS DIETAS EN EL ESTADO ÁCIDO-BASE

#### 5.1.2. EFECTOS EN EL ESTADO ÁCIDO-BASE SANGUÍNEO

##### 5.1.2.1. MÉTODO TRADICIONAL

En las tablas de resultados 24, 26, 28, 30, 32 y 34 se recogen los valores medios y desviación estándar de los principales parámetros que hemos empleado para valorar estado ácido-base en sangre arterial según el método tradicional (pH,  $p\text{CO}_2$ , bicarbonato,  $\text{CO}_2\text{t}$ , EB y *anion GAP*). En ellas se señalan, además, los momentos en los que existen diferencias estadísticamente significativas.

En las tablas 25, 27, 29, 31, 33 y 35 exponemos los resultados obtenidos tras la aplicación del análisis de varianza de doble vía mostrando los efectos de las variables independientes “tipo de dieta” y “día de muestreo” y la interacción de estas dos variables sobre los parámetros revisados anteriormente.

Para los parámetros más representativos del equilibrio ácido-básico (pH,  $p\text{CO}_2$  y  $\text{HCO}_3^-$ ) hemos incluido también una representación gráfica (gráficas 1, 2 y 3), en las que observamos

las fluctuaciones de dichos parámetros con la administración de las diferentes dietas a lo largo del tiempo.

## PH EN SANGRE ARTERIAL

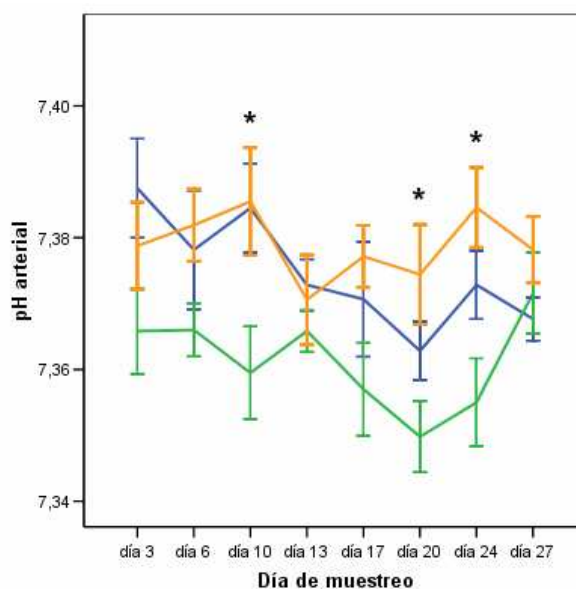
PH Arterial				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	7,366±0,022	7,388±0,018	7,379±0,023
	Día 6	7,366±0,014	7,378±0,022	7,382±0,019
Sem. 2	Día 10	7,360±0,024*	7,384±0,016	7,386±0,028
	Día 13	7,366±0,011	7,373±0,010	7,371±0,023
Sem. 3	Día 17	7,357±0,022	7,371±0,021	7,377±0,016
	Día 20	7,350±0,017*	7,363±0,011	7,374±0,026
Sem. 4	Día 24	7,355±0,021*	7,373±0,013	7,385±0,021
	Día 27	7,372±0,019	7,368±0,008	7,378±0,017

**Tabla 24:** Valores medios y desviación típica del pH en sangre arterial para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. (\*) diferencias significativas entre la dieta aniónica y la catiónica ( $p<0,05$ ). Existe una tendencia ( $p<0,1$ ) hacia diferencias estadísticas entre la dieta aniónica y la catiónica los días 6 y 17 de experimento, aunque no se alcanza el nivel de significación del 95%

pH					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	0,015	2	0,007	18,339	0,000
Muestreo	0,005	7	0,001	1,619	0,132
Dieta*Muestreo	0,005	14	0,000	0,860	0,603

**Tabla 25:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre el pH sanguíneo

A continuación para favorecer una interpretación más visual exponemos la gráfica de la evolución del pH arterial en los animales alimentados con las diferentes dietas (aniónica, control y catiónica) durante el transcurso del tiempo.



**Gráfica 1:** Representación del pH sanguíneo respecto al tiempo para cada una de las tres dietas. Las líneas representan: (♦) dieta catiónica, (♦) dieta control, (♦) dieta aniónica. (\*) diferencias significativas entre la dieta catiónica y la aniónica ( $p < 0,05$ )

## PCO<sub>2</sub> EN SANGRE ARTERIAL

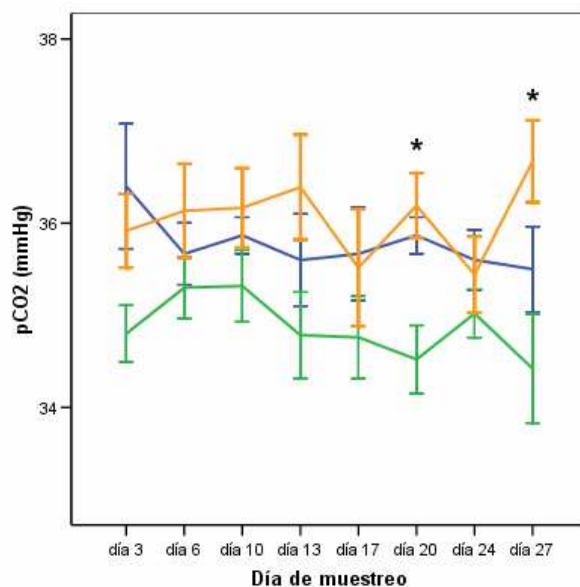
pCO <sub>2</sub>				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	34,80±1,07	36,40±1,66	35,92±1,38
	Día 6	35,30±1,17	35,67±0,82	36,13±1,77
Sem. 2	Día 10	35,32±1,35	35,87±0,48	36,17±1,50
	Día 13	34,78±1,62	35,60±1,22	36,39±1,98
Sem. 3	Día 17	34,76±1,42	35,67±1,25	35,52±2,20
	Día 20	34,52±1,17*	35,87±0,48	36,19±1,22
Sem. 4	Día 24	35,02±0,83	35,60±0,80	35,44±1,43
	Día 27	34,42±1,86*	35,50±1,14	36,67±1,48

**Tabla 26:** Valores medios y desviación típica de la pCO<sub>2</sub> (mmHg) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. (\*) diferencias significativas entre la dieta aniónica y la catiónica ( $p < 0,05$ ). Existe una tendencia ( $p < 0,1$ ) hacia diferencias estadísticas entre la dieta aniónica y la control el día 3, y entre la aniónica y la catiónica el día 13 de experimento, aunque no se alcanza el nivel de significación del 95%

pCO <sub>2</sub>					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	67,384	2	33,692	16,359	0,000
Muestreo	5,160	7	0,737	0,358	0,926
Dieta*Muestreo	18,879	14	1,348	0,655	0,816

**Tabla 27:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la pCO<sub>2</sub> sanguínea

Seguidamente, y al igual que hicimos con el pH en sangre arterial, exponemos la evolución gráfica de la pCO<sub>2</sub> de los animales alimentados con las diferentes dietas respecto al tiempo.



**Gráfica 2:** Representación de la pCO<sub>2</sub> (mmHg) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas. Las líneas representan: (♦) dieta catiónica, (♦) dieta control, (♦) dieta aniónica. (\*) diferencias estadísticamente significativas entre la dieta aniónica y la catiónica (p<0,05)



### CONCENTRACIÓN DE BICARBONATO EN SANGRE ARTERIAL

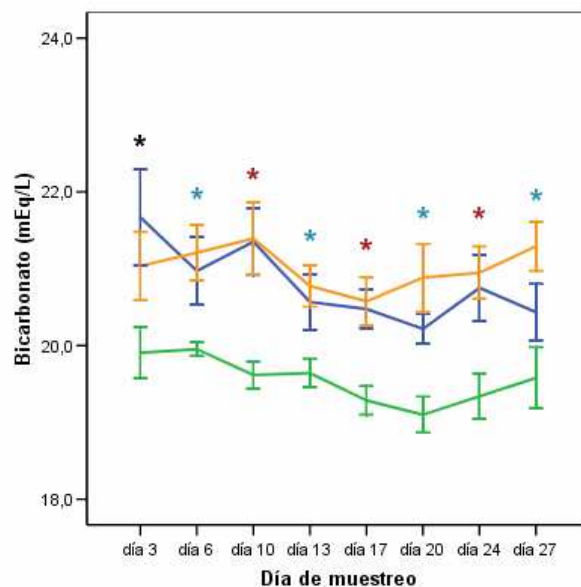
$\text{HCO}_3^-$				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	19,91±1,15*	21,67±1,53	21,03±1,55
	Día 6	19,95±0,31 <sup>†</sup>	20,97±1,08	21,21±1,24
Sem. 2	Día 10	19,62±0,60 <sup>‡</sup>	21,35±1,06	21,39±1,64
	Día 13	19,64±0,63 <sup>†</sup>	20,57±0,88	20,77±0,94
Sem. 3	Día 17	19,29±0,59 <sup>‡</sup>	20,48±0,63	20,58±1,10
	Día 20	19,10±0,74 <sup>†</sup>	20,22±0,47	20,88±1,52
Sem. 4	Día 24	19,34±0,93 <sup>‡</sup>	20,75±1,05	20,95±1,18
	Día 27	19,58±1,26 <sup>†</sup>	20,43±0,90	21,29±1,11

**Tabla 28:** Valores medios y desviación típica del bicarbonato (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. (\*) diferencias significativas de la dieta aniónica con la dieta control, (†) diferencias significativas de la dieta aniónica con la catiónica, (‡) diferencias significativas de la dieta aniónica respecto a la control y a la catiónica ( $p < 0,05$ )

$\text{HCO}_3^-$					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	106,503	2	53,251	45,339	0,000
Muestreo	16,995	7	2,428	2,067	0,048
Dieta*Muestreo	8,085	14	0,578	0,492	0,936

**Tabla 29:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración de bicarbonato sanguíneo

En la página siguiente representamos la gráfica 3, en la que podemos visualizar la evolución de las concentraciones de bicarbonato en sangre arterial respecto al tiempo para cada uno de los tres grupos.



**Gráfica 3:** Representación de la concentración de bicarbonato (mEq/L) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas. Las líneas representan: (♦) dieta catiónica, (♦) dieta control, (♦) dieta aniónica. (\*) diferencias significativas entre la dieta aniónica y la control, (\*) diferencias significativas entre la dieta aniónica y la catiónica, (\*) diferencias significativas entre la dieta aniónica y las otras dos dietas ( $p < 0,05$ )

### CONCENTRACIÓN DE CO<sub>2</sub> TOTAL EN SANGRE ARTERIAL

CO <sub>2</sub> t				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	20,95±1,17*	22,76±1,56	22,11±1,58
	Día 6	21,01±0,32†	22,04±1,09	22,29±1,28
Sem. 2	Día 10	20,68±0,59‡	22,43±1,07	22,48±1,66
	Día 13	20,69±0,68†	21,63±0,92	21,87±0,97
Sem. 3	Día 17	20,33±0,60‡	21,55±0,62	21,64±1,15
	Día 20	20,14±0,76†	21,29±0,47	21,97±1,54
Sem. 4	Día 24	20,39±0,95‡	21,82±1,08	22,01±1,21
	Día 27	20,61±1,30†	21,50±0,93	22,48±1,14

**Tabla 30:** Valores medios y desviación típica del CO<sub>2</sub>t (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. (\*) diferencias significativas de la dieta aniónica con la dieta control, (†) diferencias significativas de la dieta aniónica con la catiónica, (‡) diferencias significativas de la dieta aniónica respecto a la control y a la catiónica ( $p < 0,05$ )

CO <sub>2</sub> t					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	112,555	2	56,277	45,973	0,000
Muestreo	17,431	7	2,490	2,034	0,052
Dieta*Muestreo	8,872	14	0,634	0,518	0,921

**Tabla 31:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre el CO<sub>2</sub>t sanguíneo

## EXCESO DE BASES

BE				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	-5,45±1,48*	-3,34±1,75	-4,11±1,86
	Día 6	-5,40±0,43 <sup>†</sup>	-4,18±1,41	-3,88±1,45
Sem. 2	Día 10	-5,84±0,95 <sup>‡</sup>	-3,70±1,33	-3,64±2,04
	Día 13	-5,71±0,61 <sup>†</sup>	-4,67±0,99	-4,50±1,13
Sem. 3	Día 17	-6,21±0,84 <sup>‡</sup>	-4,80±0,92	-4,59±1,14
	Día 20	-6,51±0,83 <sup>†</sup>	-5,19±0,63	-4,33±1,90
Sem. 4	Día 24	-6,19±1,23 <sup>†</sup>	-4,49±1,26	-4,10±1,43
	Día 27	-5,68±1,46 <sup>†</sup>	-4,89±1,00	-3,77±1,30

**Tabla 32:** Valores medios y desviación típica del exceso de base (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. (\*) diferencias significativas de la dieta aniónica con la dieta control, (†) diferencias significativas de la dieta aniónica con la catiónica, (‡) diferencias significativas de la dieta aniónica respecto a la control y a la catiónica (p<0,05)

Siguiendo el mismo esquema que hemos empleado hasta ahora, en la tabla 33 resumimos los resultados del análisis de varianza de dos vías.

BE					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	151,822	2	75,911	43,881	0,000
Muestreo	26,731	7	3,819	2,207	0,035
Dieta*Muestreo	14,186	14	1,013	0,586	0,875

**Tabla 33:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre los niveles de exceso de base sanguíneo

## ANION GAP

Anion GAP				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	16,13±0,97	15,75±1,87	15,72±1,89
	Día 6	13,76±1,88	15,58±2,59	14,60±2,79
Sem. 2	Día 10	13,23±2,73	14,88±2,02	14,83±2,71
	Día 13	14,44±2,67	16,17±2,45	15,86±1,66
Sem. 3	Día 17	15,04±2,60	16,78±1,98	15,87±2,07
	Día 20	14,28±3,07	16,52±1,40	15,94±2,03
Sem. 4	Día 24	15,74±3,65	16,13±1,03	16,77±3,35
	Día 27	14,72±2,47	15,95±1,29	15,70±2,20

**Tabla 34:** Valores medios y desviación típica del *anion GAP* (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo

<i>Anion GAP</i>					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	68,292	2	34,146	6,021	0,003
Muestreo	77,104	7	11,015	1,942	0,065
Dieta*Muestreo	31,273	14	2,234	0,394	0,976

**Tabla 35:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre el *anion GAP*

El pH en sangre arterial (gráfica 1) se mantuvo prácticamente durante todo el periodo experimental ligeramente más elevado en el grupo que consumía la dieta catiónica respecto a los otros dos grupos y, aunque sólo constatamos la presencia de diferencias estadísticamente significativas los días 10, 20 y 24 de experimento, también existió una tendencia hacia la significación estadística en los días 6 y 17 entre la dieta aniónica y la catiónica ( $p < 0,1$ ).

La  $pCO_2$ , componente respiratorio del equilibrio ácido-base, permaneció prácticamente en todo momento por debajo en los animales alimentados con la dieta aniónica, aunque sólo detectamos diferencias estadísticamente significativas los días 20 y 27 de experimento de la dieta aniónica respecto a la catiónica. Además de estas variaciones, pudimos constatar una tendencia hacia la significación estadística entre dichas dietas el día 13 de nuestro desarrollo experimental y entre la aniónica y la control el día 3 ( $p < 0,1$ ). En ningún momento detectamos la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre la dieta catiónica y la control.

La concentración de bicarbonato, el  $CO_2t$  y el EB presentaron valores estadísticamente inferiores en los animales a los que se les proporcionaba la ración aniónica, tanto respecto a la dieta catiónica (días 6, 13, 20 y 27), como a la control (día 3), como a ambas (días 10, 17 y 24).

Tras la aplicación del análisis de varianza de dos vías hemos detectado que el tipo de dieta influye significativamente sobre el *anion GAP*, que proporciona información acerca de los aniones no medibles, en cambio el test de Tukey no revela la presencia de una influencia significativa del tipo de dieta sobre el mencionado parámetro, ni tan siquiera la existencia de una tendencia a la significación estadística, quizás por tratarse de una prueba bastante exigente.

### 5.1.2.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO

En este apartado exponemos en primer lugar las tablas de resultados de los principales parámetros que hemos determinado para la valoración cuantitativa del equilibrio ácido-base, que son: la DIF aproximada (tabla 36), y los cambios en el agua libre (tabla 38), en el cloro corregido (tabla 40), en los aniones no medibles (tabla 42), en la albúmina (tabla 44) y en el fósforo (tabla 46). Dichas tablas van acompañadas, a continuación, con sus respectivos análisis de varianza de doble vía donde se estudia la influencia de las variables independientes “dieta”, “día de muestreo” y de su posible interacción sobre dichos parámetros (tablas 37, 39, 41, 43, 45 y 47). Además también hemos incluido las representaciones gráficas de la variación de la DIF<sub>aproximada</sub> y del Cloro corregido respecto al tiempo, por tratarse de los parámetros en los que hemos obtenido resultados más destacados.

#### DIF<sub>APROXIMADA</sub>

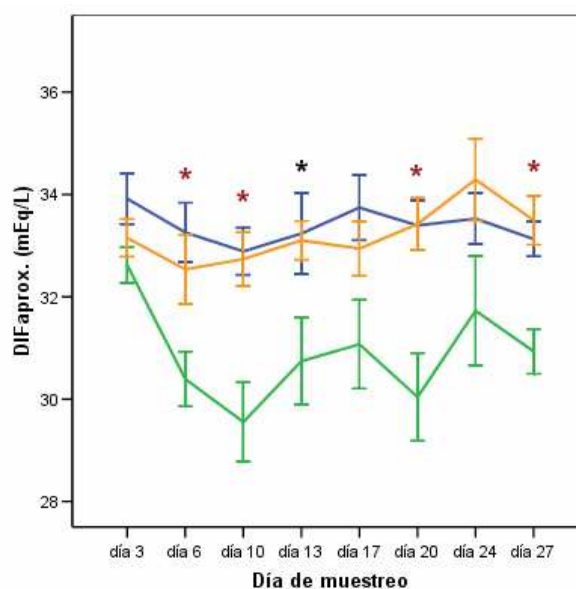
DIF aproximada				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	32,62±1,20	33,92±1,21	33,15±1,27
	Día 6	30,39±1,86 <sup>‡</sup>	33,26±1,42	32,54±2,35
Sem. 2	Día 10	29,55±2,67 <sup>‡</sup>	32,89±1,12	32,74±1,80
	Día 13	30,74±2,95*	33,24±1,95	33,10±1,32
Sem. 3	Día 17	31,07±2,74	33,74±1,56	32,94±1,85
	Día 20	30,04±2,72 <sup>‡</sup>	33,39±1,19	33,42±1,77
Sem. 4	Día 24	31,73±3,37	33,53±1,21	34,29±2,78
	Día 27	30,93±1,38 <sup>‡</sup>	33,13±0,84	33,50±1,66

**Tabla 36:** Valores medios y desviación típica de la DIF aproximada (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. (\*) diferencias significativas de la dieta aniónica respecto a la catiónica, (‡) diferencias significativas de la dieta aniónica respecto a la catiónica y a la control (p<0,05)

DIF aproximada					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	309,682	2	154,841	36,776	0,000
Muestreo	49,536	7	7,077	1,681	0,115
Dieta*Muestreo	39,339	14	2,810	0,667	0,805

**Tabla 37:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la diferencia de iones fuertes aproximada

En la siguiente gráfica aparece la evolución de este parámetro para los diferentes grupos en relación al tiempo.



**Gráfica 4:** Representación de la DIF aproximada (mEq/L) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas. Las líneas representan: (♦) dieta catiónica, (♦) dieta control, (♦) dieta aniónica. (\*) diferencias significativas entre la dieta aniónica y la catiónica ( $p < 0,05$ )

## CAMBIOS EN EL AGUA LIBRE

$\Delta$ agua libre				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	-0,42 $\pm$ 0,19	-0,46 $\pm$ 0,25	-0,35 $\pm$ 0,20
	Día 6	-0,48 $\pm$ 0,19	-0,67 $\pm$ 0,30	-0,63 $\pm$ 0,41
Sem. 2	Día 10	-0,50 $\pm$ 0,40	-0,63 $\pm$ 0,38	-0,46 $\pm$ 0,23
	Día 13	-0,50 $\pm$ 0,34	-0,46 $\pm$ 0,37	-0,40 $\pm$ 0,20
Sem. 3	Día 17	-0,45 $\pm$ 0,20	-0,46 $\pm$ 0,33	-0,40 $\pm$ 0,20
	Día 20	-0,55 $\pm$ 0,20	-0,63 $\pm$ 0,34	-0,56 $\pm$ 0,24
Sem. 4	Día 24	-0,50 $\pm$ 0,17	-0,58 $\pm$ 0,13	-0,50 $\pm$ 0,18
	Día 27	-0,40 $\pm$ 0,36	-0,71 $\pm$ 0,29	-0,46 $\pm$ 0,21

**Tabla 38:** Valores medios y desviación típica de las variaciones del agua libre (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo

$\Delta$ Agua libre					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	0,361	2	0,181	2,511	0,084
Muestreo	1,011	7	0,144	2,008	0,056
Dieta*Muestreo	0,355	14	0,025	0,353	0,986

**Tabla 39:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre las variaciones del agua libre



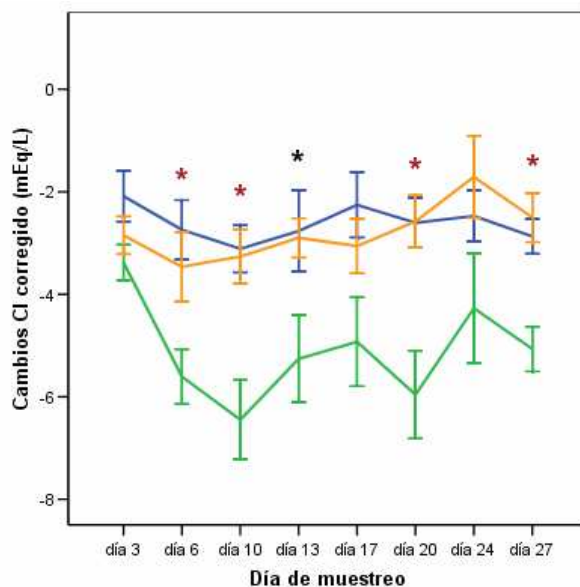
## CAMBIOS EN EL CLORO CORREGIDO

$\Delta$ Cloro corregido				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	-3,38 $\pm$ 1,20	-2,08 $\pm$ 1,21	-2,85 $\pm$ 1,27
	Día 6	-5,61 $\pm$ 1,86 <sup>‡</sup>	-2,74 $\pm$ 1,42	-3,46 $\pm$ 2,35
Sem. 2	Día 10	-6,45 $\pm$ 2,67 <sup>‡</sup>	-3,11 $\pm$ 1,12	-3,26 $\pm$ 1,80
	Día 13	-5,26 $\pm$ 2,95*	-2,76 $\pm$ 1,95	-2,90 $\pm$ 1,32
Sem. 3	Día 17	-4,93 $\pm$ 2,74	-2,26 $\pm$ 1,56	-3,06 $\pm$ 1,85
	Día 20	-5,96 $\pm$ 2,72 <sup>‡</sup>	-2,61 $\pm$ 1,19	-2,58 $\pm$ 1,77
Sem. 4	Día 24	-4,27 $\pm$ 3,37	-2,47 $\pm$ 1,21	-1,71 $\pm$ 2,78
	Día 27	-5,07 $\pm$ 1,38 <sup>‡</sup>	-2,87 $\pm$ 0,84	-2,50 $\pm$ 1,66

**Tabla 40:** Valores medios y desviación típica de las variaciones de cloro corregido (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. (\*) diferencias significativas de la dieta aniónica respecto a la catiónica, (‡) diferencias significativas de la dieta aniónica respecto a la catiónica y a la control ( $p < 0,05$ ). Existe una tendencia ( $p < 0,1$ ) hacia diferencias estadísticas entre la dieta aniónica y la control el día 17 de experimento, aunque no se alcanza el nivel de significación del 95%

$\Delta$ Cloro corregido					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	309,682	2	154,841	36,776	0,000
Muestreo	49,536	7	7,077	1,681	0,115
Dieta*Muestreo	39,339	14	2,810	0,667	0,805

**Tabla 41:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre las variaciones del cloro corregido



**Gráfica 5:** Representación de las variaciones del cloro corregido (mEq/L) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas. Las líneas representan: (♦) dieta catiónica, (♦) dieta control, (♦) dieta aniónica. (\*) diferencias significativas entre la dieta aniónica y la catiónica, (♦) diferencias significativas entre la dieta aniónica y las otras dos ( $p<0,05$ )

## CAMBIOS EN LOS ANIONES NO MEDIBLES

<b>Δ Aniones no medibles</b>				
<b>TOMA DE MUESTRAS</b>		<b>D. ANIÓNICA</b>	<b>D. CONTROL</b>	<b>D. CATIÓNICA</b>
<b>Sem. 1</b>	<b>Día 3</b>	-2,43±1,30	-1,61±2,02	-2,01±2,97
	<b>Día 6</b>	0,16±1,68	-1,50±2,74	-0,23±2,86
<b>Sem. 2</b>	<b>Día 10</b>	0,38±3,02	-0,61±2,38	-0,94±3,42
	<b>Día 13</b>	-1,03±3,02	-2,43±2,17	-1,81±1,80
<b>Sem. 3</b>	<b>Día 17</b>	-1,49±2,74	-2,95±2,29	-1,88±2,20
	<b>Día 20</b>	-0,57±3,23	2,87±1,63	-1,81±2,41
<b>Sem. 4</b>	<b>Día 24</b>	-2,22±3,65	-2,32±1,43	-2,80±3,98
	<b>Día 27</b>	-0,71±2,61	-1,81±1,23	-1,71±3,09

**Tabla 42:** Valores medios y desviación típica de las variaciones en los aniones no medibles (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo

<b>Δ Aniones no medibles</b>					
<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Significación</b>
Dieta	37,531	2	18,765	2,611	0,076
Muestreo	101,974	7	14,568	2,027	0,053
Dieta*Muestreo	34,793	14	2,485	0,346	0,987

**Tabla 43:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre las variaciones aniones no medibles

## CAMBIOS EN LA ALBÚMINA

<b>Δ Albúmina</b>				
<b>TOMA DE MUESTRAS</b>		<b>D. ANIÓNICA</b>	<b>D. CONTROL</b>	<b>D. CATIÓNICA</b>
<b>Sem. 1</b>	<b>Día 3</b>	0,96±0,34	1,07±0,44	1,17±0,86
	<b>Día 6</b>	0,91±0,45	1,07±0,10	0,96±0,41
<b>Sem. 2</b>	<b>Día 10</b>	1,04±0,24	1,05±0,26	1,14±0,61
	<b>Día 13</b>	1,14±0,32	1,30±0,50	0,99±0,42
<b>Sem. 3</b>	<b>Día 17</b>	1,24±0,20	1,15±0,29	0,88±0,40
	<b>Día 20</b>	1,05±0,27	1,21±0,32	1,28±0,50
<b>Sem. 4</b>	<b>Día 24</b>	0,94±0,57	1,21±0,41	1,18±0,40
	<b>Día 27</b>	0,87±0,44	0,81±0,68	1,17±0,72

**Tabla 44:** Valores medios y desviación típica de las variaciones de albúmina (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo

<b>Δ Albúmina</b>					
<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Significación</b>
Dieta	0,374	2	0,187	0,851	0,428
Muestreo	1,115	7	0,159	0,725	0,651
Dieta*Muestreo	2,687	14	0,192	0,874	0,588

**Tabla 45:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre las variaciones de la albúmina

## CAMBIOS EN EL FÓSFORO

$\Delta$ Fósforo				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	-0,17 $\pm$ 0,33	-0,25 $\pm$ 0,22	-0,07 $\pm$ 0,61
	Día 6	-0,28 $\pm$ 0,33	-0,34 $\pm$ 0,26	-0,52 $\pm$ 0,22
Sem. 2	Día 10	-0,31 $\pm$ 0,30	-0,40 $\pm$ 0,27	-0,13 $\pm$ 0,52
	Día 13	-0,07 $\pm$ 0,32	-0,32 $\pm$ 0,28	-0,40 $\pm$ 0,24
Sem. 3	Día 17	-0,59 $\pm$ 0,38	-0,29 $\pm$ 0,35	-0,14 $\pm$ 0,41
	Día 20	-0,48 $\pm$ 0,34	-0,29 $\pm$ 0,30	-0,65 $\pm$ 0,30
Sem. 4	Día 24	-0,14 $\pm$ 0,46	-0,32 $\pm$ 0,28	-0,27 $\pm$ 0,53
	Día 27	-0,37 $\pm$ 0,20	-0,31 $\pm$ 0,26	-0,42 $\pm$ 0,52

**Tabla 46:** Valores medios y desviación típica de las variaciones de fósforo (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo

$\Delta$ Fósforo					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	0,026	2	0,013	0,093	0,911
Muestreo	1,699	7	0,243	1,722	0,105
Dieta*Muestreo	3,367	14	0,240	1,707	0,056

**Tabla 47:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre las variaciones del fósforo

Como podemos observar, en este apartado se han analizado dos de las tres variables independientes que influyen en el equilibrio ácido-básico que son la DIF y  $A_{TOT}$ . No hemos incluido bajo este epígrafe el estudio de la  $pCO_2$ , que es la tercera variable independiente, puesto que su análisis ya figura en el apartado anterior.

En la gráfica nº 4 podemos observar como la DIF aproximada es estadísticamente inferior prácticamente durante todo el periodo experimental en el grupo alimentado con la dieta aniónica.

Durante la revisión bibliográfica pusimos de manifiesto que variaciones en esta variable podían estar ocasionadas por cambios en el agua libre, cambios en el cloro corregido y por variaciones en los aniones no medibles. En nuestro caso, el cloro corregido presenta para las tres dietas valores negativos, pero en el caso del grupo alimentado con dieta aniónica este parámetro alcanza valores significativamente más bajos que las otras dos dietas durante la mayor parte del periodo experimental. En cuanto a las variaciones en el agua libre y en los aniones no medibles, hemos obtenido valores ligeramente negativos para las tres dietas sin que hayamos detectado la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre las mismas. En el caso concreto de los cambios en el agua libre, los valores obtenidos prácticamente se encuentran durante todo el periodo experimental entre 0 y -1 para todos los grupos, por lo que se puede considerar esta disminución como despreciable.

Respecto a la otra variable que hemos estudiado  $A_{TOT}$ , como hemos visto en el apartado de revisión, se ve afectada principalmente por variaciones en las concentraciones de albúmina y de fósforo, en nuestro estudio no hemos detectado influencia de ninguna de las variables independientes estudiadas, “dieta” y “día de muestreo”, sobre estos dos parámetros en el transcurso de todo el periodo experimental.

### **5.1.3. EFECTOS EN EL ESTADO ÁCIDO-BÁSICO URINARIO: PH URINARIO**

En la tabla número 48 se recogen los valores medios y desviación típica del único parámetro que hemos empleado para valorar estado ácido-base en orina (pH urinario). En ellas se señalan, además, los momentos en los que existen diferencias estadísticamente significativas.

En la tabla número 49 observamos los efectos de las principales variables independientes y de la interacción entre ambas sobre el pH urinario.

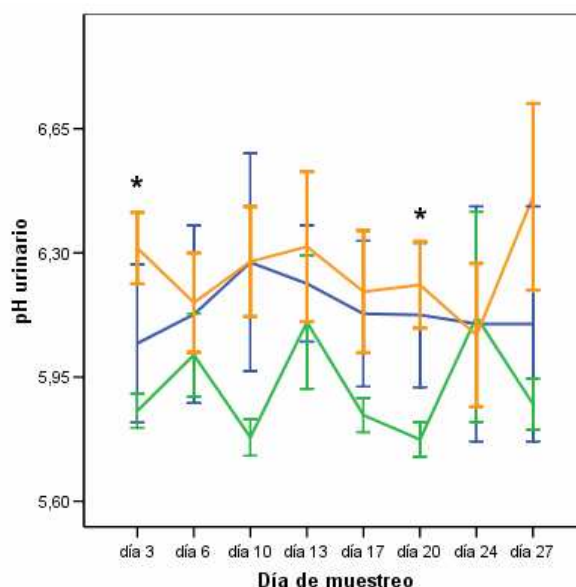
Al final de este apartado hemos querido dejar reflejada la representación gráfica de la variación temporal del pH urinario en los tres grupos (Gráfica 6).

pH urinario				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	5,86±0,16*	6,05±0,55	6,31±0,33
	Día 6	6,01±0,40	6,13±0,61	6,16±0,48
Sem. 2	Día 10	5,78±0,16	6,27±0,75	6,28±0,54
	Día 13	6,11±0,65	6,21±0,40	6,32±0,74
Sem. 3	Día 17	5,84±0,13	6,13±0,50	6,19±0,60
	Día 20	5,77±0,15*	6,13±0,50	6,21±0,42
Sem. 4	Día 24	6,12±0,94	6,10±0,81	6,07±0,70
	Día 27	5,87±0,23	6,10±0,81	6,46±0,87

**Tabla 48:** Valores medios y desviación típica del pH urinario para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. (\*) diferencias estadísticamente significativas entre la dieta aniónica y la dieta catiónica ( $p < 0,05$ ). Existe una tendencia ( $p < 0,1$ ) hacia diferencias estadísticas entre la dieta aniónica y la catiónica el día 10 de experimento, aunque no se alcanza el nivel de significación del 95%

pH urinario					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	4,824	2	2,412	7,678	0,001
Muestreo	0,564	7	0,081	0,257	0,970
Dieta*Muestreo	2,053	14	0,147	0,467	0,948

**Tabla 49:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre el pH urinario



**Gráfica 6:** Representación del pH urinario respecto al tiempo para cada una de las tres dietas. Las líneas representan: (●) dieta catiónica, (◆) dieta control, (◆) dieta aniónica. (\*) diferencias significativas entre la dieta aniónica y la catiónica ( $p < 0,05$ )

Como podemos observar, el pH urinario presenta valores inferiores durante la mayor parte del estudio en el grupo alimentado con la dieta aniónica, aunque sólo aparecen diferencias estadísticamente significativas entre los animales alimentados con dieta catiónica y los alimentados con la aniónica el día 3 y el 20 del periodo experimental. Además también aparece una tendencia hacia la significación estadística el día 10 entre esos mismos grupos.

## 5.2. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE LOS MINERALES Y ELECTROLITOS SANGUÍNEOS

En este apartado, expondremos los resultados obtenidos a lo largo de los 27 días de duración del estudio con la aplicación de las tres dietas para algunos de los minerales presentes en el plasma. En el primer subapartado hemos reunido al sodio, al potasio y al cloro, por tratarse de los electrolitos que estamos modificando en la dieta, y en el segundo al calcio, fósforo y magnesio que son minerales que se encuentran estrechamente asociados al metabolismo óseo.

### 5.2.1. SODIO, POTASIO Y CLORO

En las tablas de resultados 50, 52 y 54 exponemos las concentraciones plasmáticas de estos tres electrolitos en forma de media y desviación típica. Cada una de ellas va acompañada por la tabla que resume el análisis de varianza de dos vías (tablas 51, 53 y 55) donde queda reflejada la influencia de los variables independientes “tipo de dieta” y “día de administración” sobre los electrolitos sanguíneos (sodio, potasio y cloro). En esta sección también hemos querido representar de forma gráfica la evolución de las concentraciones de potasio y cloro respecto al tiempo para cada uno de los grupos.

#### CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE SODIO

SODIO				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	146,33±0,78	146,17±0,98	146,58±0,79
	Día 6	145,67±0,78	145,33±1,21	145,50±1,62
Sem. 2	Día 10	146,00±1,60	145,50±1,52	146,17±0,94
	Día 13	146,00±1,35	146,17±1,47	146,42±0,79
Sem. 3	Día 17	146,20±0,79	146,17±1,33	146,42±0,79
	Día 20	145,80±0,79	145,50±1,38	145,75±0,97
Sem. 4	Día 24	146,00±0,67	145,67±0,52	146,00±0,74
	Día 27	146,40±1,43	145,17±1,17	146,17±0,84

**Tabla 50:** Valores medios y desviación típica de las concentraciones de sodio (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo

SODIO					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	5,777	2	2,889	2,511	0,084
Muestreo	16,168	7	2,310	2,008	0,056
Dieta*Muestreo	5,678	14	0,406	0,353	0,986

**Tabla 51:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de sodio



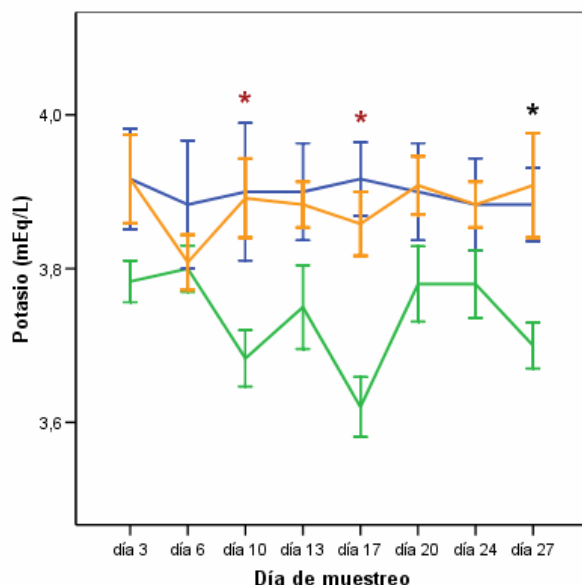
## CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE POTASIO

POTASIO				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	3,78±0,09	3,92±0,16	3,92±0,20
	Día 6	3,80±0,10	3,88±0,20	3,81±0,12
Sem. 2	Día 10	3,68±0,13 <sup>†</sup>	3,90±0,22	3,89±0,18
	Día 13	3,75±0,19	3,90±0,15	3,88±0,10
Sem. 3	Día 17	3,62±0,12 <sup>†</sup>	3,92±0,12	3,86±0,14
	Día 20	3,78±0,15	3,90±0,15	3,91±0,13
Sem. 4	Día 24	3,78±0,14	3,88±0,15	3,88±0,10
	Día 27	3,70±0,94*	3,88±0,12	3,91±0,24

**Tabla 52:** Valores medios y desviación típica de las concentraciones de potasio (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. (†) diferencias significativas de la dieta aniónica respecto a la dieta catiónica y a la control, (\*) diferencias significativas entre la dieta aniónica y la catiónica (p<0,05)

POTASIO					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	1,237	2	0,619	27,560	0,000
Muestreo	0,099	7	0,014	0,631	0,730
Dieta*Muestreo	0,269	14	0,019	0,855	0,608

**Tabla 53:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de potasio



**Gráfica 7:** Representación de la concentración de potasio (mEq/L) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas. Las líneas representan: (♦) dieta catiónica, (♦) dieta control, (♦) dieta aniónica. (\*) diferencias significativas entre dieta aniónica y catiónica, (\*) diferencias significativas de la dieta aniónica respecto a la control y a la catiónica ( $p < 0,05$ )

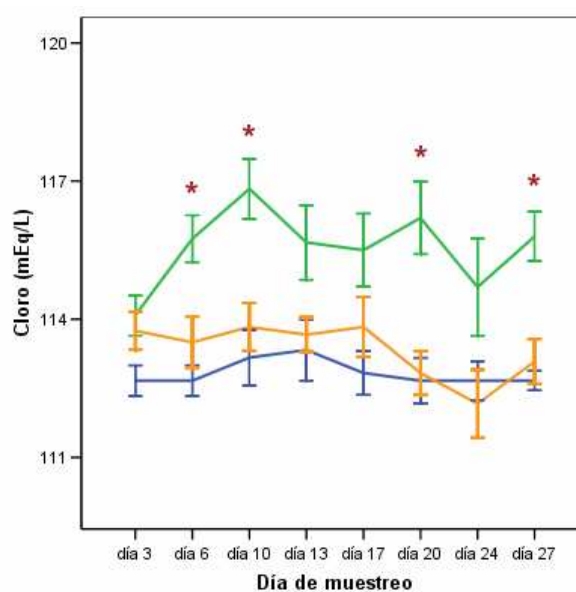
## CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE CLORO

CLORO				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	114,08±1,51	112,67±0,82	113,75±1,42
	Día 6	115,75±1,76 <sup>†</sup>	112,67±0,82	113,50±1,93
Sem. 2	Día 10	116,83±2,25 <sup>†</sup>	113,17±1,47	113,83±1,80
	Día 13	115,67±2,81	113,33±1,63	113,67±1,30
Sem. 3	Día 17	115,50±2,51	112,83±1,17	113,83±2,25
	Día 20	116,20±2,49 <sup>†</sup>	112,67±1,21	112,83±1,64
Sem. 4	Día 24	114,70±3,34	112,67±1,03	112,17±2,55
	Día 27	117,80±1,69 <sup>†</sup>	112,67±0,52	113,08±1,68

**Tabla 54:** Valores medios y desviación típica de las concentraciones de cloro (mEq/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. (†) diferencias significativas de la dieta aniónica respecto a la control y a la catiónica ( $p < 0,05$ ). Existe una tendencia ( $p < 0,1$ ) hacia diferencias estadísticas de la dieta aniónica respecto a la catiónica y a la control el día 13, de la dieta aniónica respecto a la control el día 17 y de la dieta aniónica respecto a la catiónica el día 24 de experimento, aunque no se alcanza el nivel de significación del 95%

CLORO					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	320,996	2	160,498	41,915	0,000
Muestreo	34,968	7	4,995	1,305	0,250
Dieta*Muestreo	43,106	14	3,079	0,804	0,664

**Tabla 55:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de cloro



**Gráfica 8:** Representación de la concentración de cloro (mEq/L) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas. Las líneas representan: (♦) dieta catiónica, (♦) dieta control, (♦) dieta aniónica. (\*) diferencias significativas de la dieta aniónica respecto a la control y a la catiónica ( $p < 0,05$ )

Como podemos observar en las tablas y gráficas anteriores, no hemos detectado la presencia de una influencia estadísticamente significativa del tiempo de administración de las dietas sobre los electrolitos (sodio, potasio y cloro). Además, en caso concreto del sodio tampoco aparece influencia del tipo de dieta administrada (aniónica, control y catiónica).

Respecto a las concentraciones de potasio podemos observar como sus niveles se mantuvieron más bajos en el grupo de animales alimentados con la dieta aniónica respecto a los otros dos grupos, siendo estas disminuciones estadísticamente significativas los días 10 y 17 del periodo experimental. Además de este hecho, entre la dieta aniónica y la catiónica las diferencias entre las concentraciones de potasio también resultaron estadísticamente significativas el día 27, mientras que entre dieta catiónica y la control no aparecen diferencias significativas en ningún momento.

En el caso de los niveles de cloro tampoco se observan diferencias significativas entre los grupos alimentados con la dieta control y la catiónica, sin embargo en el grupo al que se le suministró la dieta aniónica las concentraciones de cloro fueron de mayor entidad, alcanzándose significación en los días 6, 10, 20 y 27 de nuestro experimento tanto respecto a los animales alimentados con dieta catiónica como a los que recibieron la alimentación control. Además se observa una tendencia a la significación estadística el día 13 del grupo con dieta aniónica respecto a la catiónica y a la control, el día 17 de la dieta aniónica respecto a la control y el día 24 de la dieta aniónica respecto a la catiónica.

A modo de resumen podemos decir que la administración de la dieta aniónica provoca cambios significativos sobre los niveles de potasio y cloro plasmáticos, mientras que en nuestro estudio la dieta catiónica no presentó ningún efecto significativo sobre dichos electrolitos. En ningún momento del periodo experimental hemos constatado una influencia significativa del tipo de dieta sobre las concentraciones sanguíneas de sodio.

### **5.2.2. CALCIO, FÓSFORO Y MAGNESIO**

En las tablas 56, 58, 60 y 62 exponemos los resultados que hemos obtenido para los siguientes minerales plasmáticos: calcio, tanto en su forma iónica como total, fósforo y magnesio. Del mismo modo a como hemos realizado con el resto de los parámetros, los resultados están reflejados en forma de media  $\pm$  desviación típica.

Cada una de las tablas anteriores la hemos acompañado de la tabla resumen del análisis de varianza de dos vías, en la que se estudia la influencia de las variables independientes “tipo de dieta” y “día de muestreo” así como la interacción entre ambas sobre los diferentes parámetros.

En el apartado destinado al calcio iónico también hemos querido incluir la gráfica de la evolución sus concentraciones respecto al tiempo para cada uno de los tres grupos, puesto que en este parámetro es en el que hemos obtenido resultados más destacables.

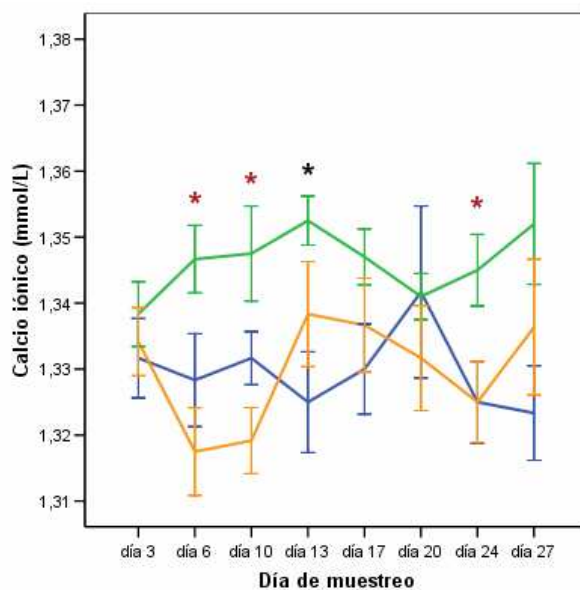
### CONCENTRACIONES DE CALCIO IÓNICO

iCa <sup>2+</sup>				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	1,34±0,02	1,33±0,02	1,33±0,02
	Día 6	1,35±0,02*	1,33±0,02	1,32±0,02
Sem. 2	Día 10	1,35±0,02*	1,33±0,01	1,32±0,02
	Día 13	1,35±0,01 <sup>†</sup>	1,33±0,02	1,34±0,03
Sem. 3	Día 17	1,35±0,01	1,33±0,02	1,34±0,03
	Día 20	1,34±0,01	1,34±0,03	1,34±0,02
Sem. 4	Día 24	1,35±0,02*	1,33±0,02	1,33±0,03
	Día 27	1,35±0,03	1,32±0,02	1,34±0,03

**Tabla 56:** Valores medios y desviación típica de las concentraciones de calcio iónico (mmol/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. (\*) diferencias estadísticamente significativas de la dieta aniónica respecto catiónica, (<sup>†</sup>) diferencias estadísticamente significativas de la dieta aniónica respecto a la control y a la dieta catiónica (p<0,05)

iCa <sup>2+</sup>					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	0,015	2	0,007	16,091	0,000
Muestreo	0,002	7	0,000	0,569	0,781
Dieta*Muestreo	0,006	14	0,000	0,943	0,514

**Tabla 57:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de calcio iónico



**Gráfica 9:** Representación de la concentración de calcio iónico (mmol/L) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas. Las líneas representan: (♦) dieta catiónica, (♦) dieta control, (♦) dieta aniónica. (\*) diferencias significativas entre dieta aniónica y control, (\*) diferencias significativas entre la dieta aniónica y la catiónica ( $p < 0,05$ )

## CONCENTRACIONES DE CALCIO TOTAL

CALCIO TOTAL				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	10,34±0,12	10,38±0,26	10,37±0,16
	Día 6	10,55±0,24	10,45±0,18	10,55±0,24
Sem. 2	Día 10	10,52±0,13	10,49±0,20	10,52±0,21
	Día 13	10,46±0,24	10,44±0,15	10,48±0,28
Sem. 3	Día 17	10,58±0,23	10,47±0,17	10,54±0,18
	Día 20	10,44±0,24	10,43±0,24	10,44±0,46
Sem. 4	Día 24	10,42±0,14	10,49±0,17	10,38±0,31
	Día 27	10,48±0,18	10,55±0,14	10,32±0,26

**Tabla 58:** Valores medios y desviación típica de las concentraciones de calcio total (mg/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo

CALCIO TOTAL					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	0,170	2	0,085	1,594	0,205
Muestreo	0,591	7	0,084	1,587	0,141
Dieta*Muestreo	0,405	14	0,029	0,544	0,904

**Tabla 59:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de calcio total

## CONCENTRACIONES DE FÓSFORO

FÓSFORO				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	4,60±0,56	4,74±0,38	4,42±1,05
	Día 6	4,78±0,57	4,89±0,45	5,20±0,38
Sem. 2	Día 10	4,84±0,51	4,99±0,46	4,52±0,90
	Día 13	4,42±0,54	4,85±0,48	4,99±0,42
Sem. 3	Día 17	5,31±0,65	4,79±0,60	4,54±0,71
	Día 20	5,13±0,59	4,80±0,51	5,42±0,51
Sem. 4	Día 24	4,54±0,80	4,85±0,47	4,76±0,91
	Día 27	4,94±0,35	4,84±0,44	5,03±0,89

**Tabla 60:** Valores medios y desviación típica de las concentraciones de fósforo (mg/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo

FÓSFORO					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	0,078	2	0,039	0,093	0,911
Muestreo	5,028	7	0,718	1,722	0,105
Dieta*Muestreo	9,966	14	0,712	1,707	0,056

**Tabla 61:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de fósforo

## CONCENTRACIONES DE MAGNESIO

MAGNESIO				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	2,22±0,05	2,22±0,19	2,18±0,21
	Día 6	2,20±0,06	2,24±0,19	2,25±0,11
Sem. 2	Día 10	2,27±0,05	2,23±0,12	2,22±0,23
	Día 13	2,22±0,11	2,24±0,07	2,24±0,06
Sem. 3	Día 17	2,24±0,07	2,25±0,04	2,18±0,10
	Día 20	2,24±0,11	2,21±0,06	2,27±0,07
Sem. 4	Día 24	2,28±0,09	2,24±0,08	2,24±0,10
	Día 27	2,30±0,05	2,28±0,05	2,22±0,04

**Tabla 62:** Valores medios y desviación típica de las concentraciones de magnesio (mg/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo

MAGNESIO					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	0,028	2	0,014	1,048	0,352
Muestreo	0,063	7	0,009	0,675	0,693
Dieta*Muestreo	0,118	14	0,008	0,632	0,837

**Tabla 63:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de magnesio

Como podemos ver en las tablas del análisis de varianza de dos vías, el tiempo de administración de las dietas no modificó significativamente ninguno de los minerales en estudio.

Las concentraciones de calcio total no presentaron cambios estadísticamente significativos con el tipo de dieta, donde si que se produjeron variaciones fue en el calcio iónico puesto que en los animales alimentados con la dieta aniónica las concentraciones sanguíneas de este parámetro alcanzaron valores significativamente superiores los días 6, 10, 13 y 24 de nuestro



periodo experimental. Por otro lado, entre la dieta aniónica y la control no se produjeron en ningún momento diferencias estadísticamente significativas.

No encontramos influencia del tipo de dieta administrada ni del día de muestreo sobre las concentraciones plasmáticas de fósforo y de magnesio.

### 5.3. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE OTROS PARÁMETROS HEMÁTICOS: HEMATOCRITO Y HEMOGLOBINA

En las tablas 64 y 66 recogemos las medias y desviaciones típicas del hematocrito y la hemoglobina para los diferentes grupos a largo del periodo experimental. Los mencionados resultados se acompañan de las tablas 65 y 67, en las cuales queda reflejado un resumen del análisis de varianza de doble vía, realizado para estudiar la influencia de las variables independientes “tipo de dieta” y “día de muestreo” y la posible interacción entre las mismas sobre dichos parámetros hematológicos.

#### VALOR HEMATOCRITO

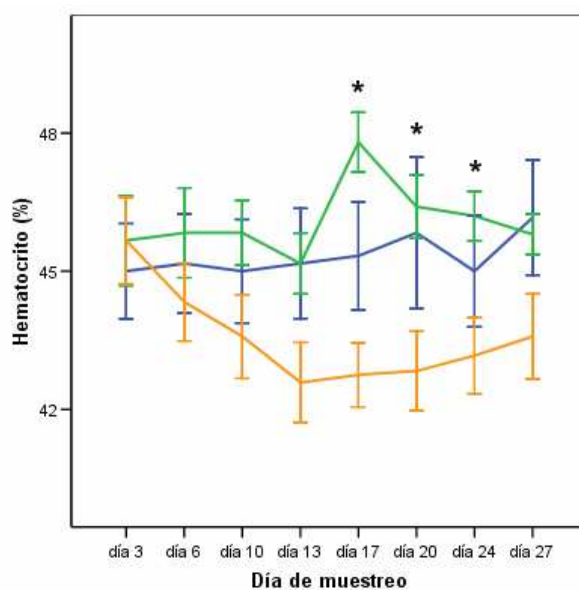
HEMATOCRITO				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	45,67±3,39	45,00±2,53	45,67±3,26
	Día 6	45,83±3,38	45,17±2,64	44,33±2,93
Sem. 2	Día 10	45,83±2,44	45,00±2,76	43,58±3,15
	Día 13	45,17±2,29	45,17±2,93	42,58±3,03
Sem. 3	Día 17	47,80±2,04*	45,33±2,88	42,75±2,42
	Día 20	46,40±2,17*	45,83±4,02	42,83±2,98
Sem. 4	Día 24	46,20±1,68*	45,00±2,97	43,17±2,86
	Día 27	45,80±1,40	46,17±3,06	43,58±3,20

**Tabla 64:** Valores medios y desviación típica del valor hematocrito (%) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. (\*) diferencias significativas entre la dieta aniónica y la catiónica ( $p < 0,05$ )

HEMATOCRITO					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	303,749	2	151,874	19,201	0,000
Muestreo	23,949	7	3,421	0,433	0,881
Dieta*Muestreo	105,868	14	7,562	0,956	0,500

**Tabla 65:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre el valor hematocrito

Seguidamente, con el fin de facilitar la interpretación de los resultados, ofrecemos una representación gráfica de la evolución del valor hematocrito respecto al tiempo para cada una de las dietas:



**Gráfica 10:** Representación del valor hematocrito (%) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas. Las líneas representan: (♦) dieta catiónica, (◆) dieta control, (◆) dieta aniónica. (\*) diferencias significativas entre dieta aniónica y catiónica ( $p < 0,05$ )

## CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA

HEMOGLOBINA				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	15,53±1,15	15,30±0,86	15,53±1,11
	Día 6	15,58±1,15	15,36±0,90	15,07±1,00
Sem. 2	Día 10	15,58±0,83	15,30±0,94	14,82±1,07
	Día 13	15,36±0,78	15,53±0,99	14,48±1,03
Sem. 3	Día 17	16,25±0,69*	15,41±0,98	14,54±0,82
	Día 20	15,78±0,74*	15,58±1,37	14,56±1,01
Sem. 4	Día 24	15,71±0,57*	15,30±1,01	14,68±0,97
	Día 27	15,57±0,48	15,70±1,04	14,82±1,09

**Tabla 66:** Valores medios y desviación típica de las concentraciones de hemoglobina (g/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. (\*) diferencias significativas entre la dieta aniónica y la catiónica ( $p < 0,05$ )

HEMOGLOBINA					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	35,107	2	17,554	19,202	0,000
Muestreo	2,783	7	0,389	0,435	0,880
Dieta*Muestreo	12,230	14	0,874	0,956	0,500

**Tabla 67:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de hemoglobina

Como podemos ver en las tablas anteriores el tipo de dieta influye sobre el valor hematocrito y la concentración de hemoglobina, resulta interesante observar como el grupo de animales que recibió dieta catiónica presenta niveles inferiores de estos dos parámetros respecto a los otros dos grupos, mientras que en los animales que reciben la dieta aniónica ocurre lo contrario. Vemos como en los días 17, 20 y 24 de experimento el porcentaje de hematocrito y las concentraciones de hemoglobina son significativamente más altas en el grupo que recibió la alimentación aniónica respecto al que recibió la catiónica.

## 5.4. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS: GLUCOSA, PROTEÍNAS TOTALES, ALBÚMINA, UREA Y CREATININA

A lo largo de este apartado reflejamos las concentraciones obtenidas durante el periodo de aplicación de cada una de las dietas para la glucosa (tabla 68), las proteínas totales (tabla 70), la albúmina (tabla 72) y la creatinina (tabla 74) en forma de medias y desviaciones típicas. A continuación de cada una de las tablas de resultados mencionadas incluiremos un resumen del análisis de varianza de doble vía donde se estudia la influencia de las variables independientes “tipo de dieta” y del “día de muestreo” y de la posible interacción entre ambas sobre los parámetros mencionados.

### CONCENTRACIONES DE GLUCOSA

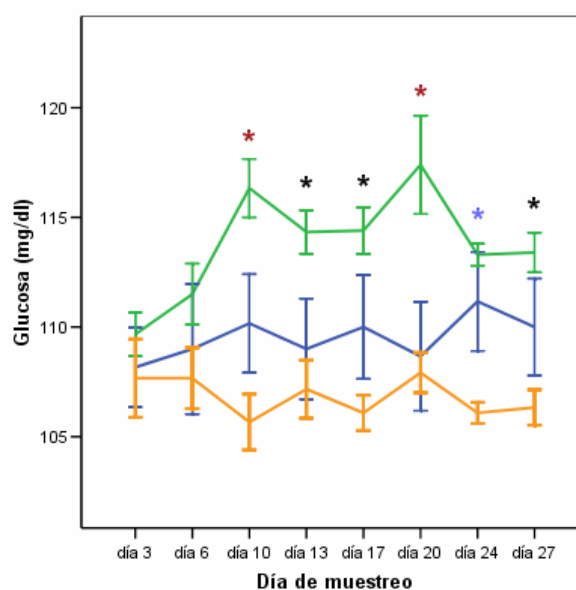
GLUCOSA				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	109,67±3,45	108,17±4,45	107,67±6,17
	Día 6	111,50±4,82	109,00±7,27	107,67±4,81
Sem. 2	Día 10	116,33±4,62 <sup>‡</sup>	110,17±5,49	105,67±4,42
	Día 13	114,33±3,45*	109,00±5,62	107,17±4,59
Sem. 3	Día 17	114,40±3,37*	110,00±5,80	106,08±2,81
	Día 20	117,40±7,11 <sup>‡</sup>	108,67±6,09	107,92±3,18
Sem. 4	Día 24	113,30±1,57	111,17±5,53	106,08±1,68 <sup>‡</sup>
	Día 27	113,40±2,88*	110,00±5,40	106,33±2,81

**Tabla 68:** Valores medios y desviación típica de las concentraciones de glucosa (mg/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. (\*) diferencias entre la dieta aniónica y la catiónica, (‡) diferencias significativas de la dieta marcada respecto a las otras dos dietas (p<0,05)

GLUCOSA					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	2234,692	2	1117,346	55,824	0,000
Muestreo	132,453	7	18,922	0,945	0,473
Dieta*Muestreo	414,272	14	29,591	1,478	0,121

**Tabla 69:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de glucosa

Teniendo en cuenta los resultados que hemos obtenido para la glucosa (tabla 67), hemos considerado oportuno reflejarlos en forma de gráfica con el fin de favorecer su interpretación visual. De modo que en la gráfica 69 reflejamos la evolución de este parámetro respecto al tiempo para cada uno de los grupos.



**Gráfica 11:** Representación de la concentración de glucosa (mg/dl) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas. Las líneas representan: (♦) dieta catiónica, (♦) dieta control, (♦) dieta aniónica. (\*) diferencias significativas entre dieta aniónica y catiónica, (\*) diferencias significativas de la dieta aniónica respecto a la control y a la catiónica, (\*) diferencias significativas de la dieta catiónica respecto a la control y a la aniónica ( $p < 0,05$ )

## CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

PROTEÍNAS TOTALES				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	6,19±0,22	6,04±0,29	6,10±0,41
	Día 6	6,14±0,32	6,19±0,23	6,21±0,30
Sem. 2	Día 10	6,12±0,24	6,14±0,18	6,18±0,40
	Día 13	5,96±0,25	6,12±0,28	6,20±0,31
Sem. 3	Día 17	6,13±0,26	6,18±0,09	6,15±0,25
	Día 20	6,01±0,13	6,17±0,18	6,17±0,28
Sem. 4	Día 24	6,25±0,19	6,16±0,08	6,23±0,27
	Día 27	6,24±0,15	6,20±0,22	6,07±0,22

**Tabla 70:** Valores medios y desviación típica de las concentraciones de proteínas totales (g/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo

PROTEÍNAS TOTALES					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	0,048	2	0,024	0,343	0,710
Muestreo	0,291	7	0,042	0,593	0,761
Dieta*Muestreo	0,811	14	0,058	0,825	0,641

**Tabla 71:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de proteínas totales

## CONCENTRACIÓN DE ALBÚMINA

ALBÚMINA				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	3,34±0,09	3,31±0,12	3,28±0,23
	Día 6	3,35±0,12	3,31±0,03	3,34±0,11
Sem. 2	Día 10	3,32±0,07	3,32±0,07	3,29±0,16
	Día 13	3,29±0,09	3,25±0,13	3,33±0,11
Sem. 3	Día 17	3,26±0,05	3,29±0,08	3,36±0,11
	Día 20	3,32±0,07	3,27±0,09	3,26±0,14
Sem. 4	Día 24	3,35±0,15	3,27±0,11	3,28±0,11
	Día 27	3,37±0,12	3,38±0,18	3,28±0,19

**Tabla 72:** Valores medios y desviación típica de las concentraciones de albúmina (g/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo

ALBÚMINA					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	0,027	2	0,014	0,851	0,428
Muestreo	0,081	7	0,012	0,725	0,651
Dieta*Muestreo	0,196	14	0,014	0,874	0,588

**Tabla 73:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de albúmina

## CONCENTRACIÓN DE UREA

UREA				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	23,18±5,34	23,81±5,12	22,69±1,87
	Día 6	22,13±3,39	24,48±3,83	23,54±3,26
Sem. 2	Día 10	22,22±2,02	23,82±3,86	22,75±2,34
	Día 13	21,83±2,47	22,74±5,01	23,43±3,09
Sem. 3	Día 17	21,75±1,94	24,58±3,00	24,43±3,43
	Día 20	22,94±2,13	23,41±4,10	22,11±3,27
Sem. 4	Día 24	23,68±2,03	23,74±3,51	22,51±2,53
	Día 27	22,68±2,37	20,67±2,34	24,56±4,67

**Tabla 74:** Valores medios y desviación típica de las concentraciones de urea (mg/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo

UREA					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	31,612	2	15,806	1,485	0,229
Muestreo	22,947	7	3,278	0,308	0,950
Dieta*Muestreo	151,270	14	10,805	1,015	0,439

**Tabla 75:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de urea



## CONCENTRACIÓN DE CREATININA

CREATININA				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	1,08±0,07	1,12±0,11	1,13±0,09
	Día 6	1,13±0,05	1,11±0,06	1,13±0,11
Sem. 2	Día 10	1,12±0,07	1,13±0,06	1,13±0,07
	Día 13	1,08±0,09	1,13±0,04	1,15±0,05
Sem. 3	Día 17	1,08±0,08	1,14±0,04	1,15±0,15
	Día 20	1,10±0,07	1,08±0,06	1,07±0,11
Sem. 4	Día 24	1,06±0,08	1,11±0,09	1,08±0,08
	Día 27	1,08±0,08	1,14±0,05	1,11±0,09

**Tabla 76:** Valores medios y desviación típica de las concentraciones de creatinina (mg/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo

CREATININA					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	0,042	2	0,021	2,995	0,052
Muestreo	0,063	7	0,009	1,301	0,251
Dieta*Muestreo	0,063	14	0,005	0,646	0,824

**Tabla 77:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de creatinina

Como resumen de los resultados expuesto en este apartado podemos mencionar que las concentraciones de glucosa alcanzan valores más altos en el grupo que recibió la dieta aniónica. Por el contrario, en el grupo alimentado con la ración catiónica sus valores se mantienen en niveles inferiores durante todo el periodo experimental sólo manifestándose

diferencias significativas respecto a los otros dos grupos el día 24. Como podemos ver en la tabla 68, en los días 10 y 20 los valores de glucosa son significativamente superiores en el grupo que recibió la alimentación aniónica respecto a los otros dos, mientras que en los días 13, 17 y 27 del periodo experimental existen diferencias estadísticamente significativas entre la dieta aniónica y la catiónica.

En lo que respecta a las proteínas totales, albúmina, urea y creatinina plasmática, no se manifiesta una influencia importante del tipo de dieta ni del tiempo, puesto que en ningún momento aparecen diferencias estadísticas.

## 5.5. EFECTO DE LAS DIETAS SOBRE EL CORTISOL SÉRICO

En la siguiente tabla exponemos los resultados obtenidos para el cortisol sérico en forma de media y desviación típica.

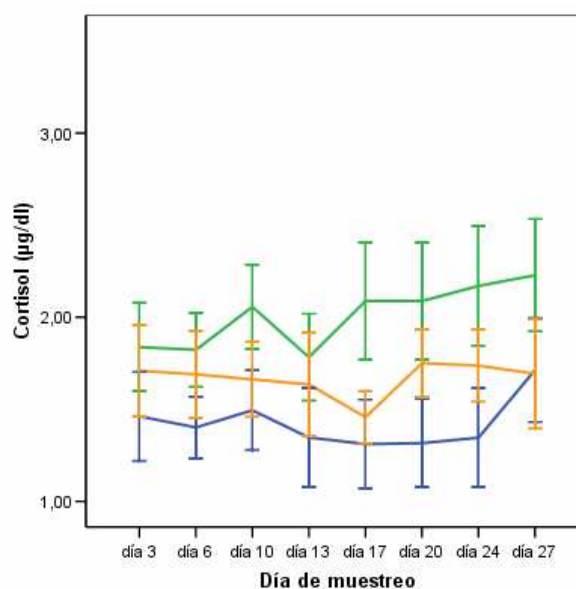
CORTISOL				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	1,84±0,83	1,46±0,59	1,71±0,86
	Día 6	1,82±0,70	1,40±0,41	1,69±0,82
Sem. 2	Día 10	2,06±0,80	1,50±0,53	1,66±0,71
	Día 13	1,78±0,82	1,35±0,66	1,64±0,97
Sem. 3	Día 17	2,09±1,01	1,31±0,59	1,46±0,49
	Día 20	2,08±1,01	1,32±0,59	1,75±0,63
Sem. 4	Día 24	2,17±1,02	1,35±0,66	1,74±0,68
	Día 27	2,23±0,97	1,71±0,69	1,69±1,02

**Tabla 78:** Valores medios y desviación típica de las concentraciones de cortisol sérico (µg/dl) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. Existe una tendencia ( $p<0,1$ ) hacia diferencias estadísticas entre la dieta aniónica y la control el día 5, aunque no se alcanza el nivel de significación del 95%

En la tabla que a continuación se expone figuran los resultados obtenidos en el análisis de varianza de dos vías.

CORTISOL					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	11,629	2	5,814	9,124	0,000
Muestreo	1,565	7	0,224	0,351	0,929
Dieta*Muestreo	2,051	14	0,146	0,230	0,998

**Tabla 79:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración sérica de cortisol



**Gráfica 12:** Representación de la concentración del cortisol sérico (µg/dl) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas. Las líneas representan: (♦) dieta catiónica, (♦) dieta control, (♦) dieta aniónica

Cuando analizamos la influencia de la variable “dieta” sobre la concentración de cortisol sérico podemos, a través del análisis de varianza de dos vías, observar como dicha variable independiente presenta un efecto significativo. En cambio, en el momento en el que la consideramos como un efecto principal y aplicamos el test de Tukey, no detectamos diferencias puesto que dicho test estadístico presenta alto grado de exigencia. De todos modos, en el día 17 de experimento aparece una tendencia hacia la significación estadística ( $p < 0,1$ ) y, como observamos gráficamente, los niveles de cortisol que aparecen en el grupo

alimentado con la dieta ácida son superiores a los que aparecen en los otros dos grupos, aunque no detectamos una significación estadística clara.

## 5.6. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE LOS MARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA

### 5.6.1. TELOPÉPTIDO CARBOXITERMINAL DE COLÁGENO TIPO I (TCTI)

En la tabla 80 se recogen los resultados hallados para las concentraciones de TCTI en forma de media  $\pm$  desviación típica, a lo largo de todo el periodo experimental. Mientras que en la tabla 81 expresamos los resultados del efecto de las variables independientes “tipo de dieta” y “día de muestreo” y de la interacción entre ambas sobre el telopéptido carboxiterminal de colágeno tipo I. Finalmente, en la gráfica 13, representamos la evolución en el tiempo de los niveles de dicho marcador de resorción ósea para cada uno de los tres grupos empleados (dieta control, aniónica y catiónica).

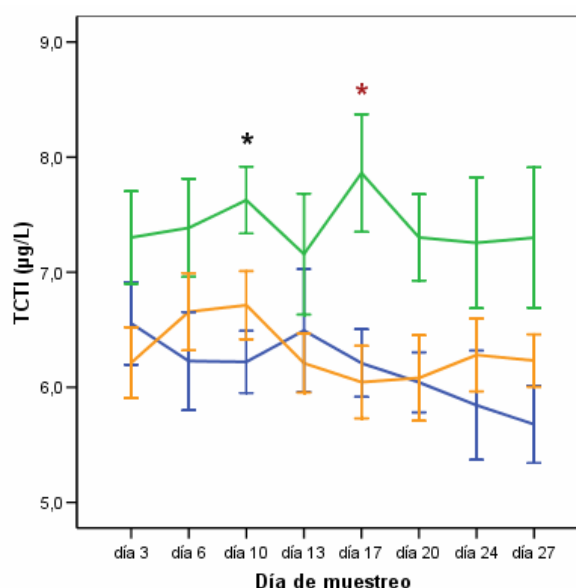
TCTI				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	7,30 $\pm$ 1,39	6,55 $\pm$ 0,88	6,21 $\pm$ 1,07
	Día 6	7,39 $\pm$ 1,48	6,23 $\pm$ 1,04	6,66 $\pm$ 1,16
Sem. 2	Día 10	7,63 $\pm$ 1,01*	6,22 $\pm$ 0,66	6,71 $\pm$ 1,02
	Día 13	7,16 $\pm$ 1,82	6,49 $\pm$ 1,31	6,21 $\pm$ 0,89
Sem. 3	Día 17	7,86 $\pm$ 1,62 <sup>†</sup>	6,21 $\pm$ 0,72	6,05 $\pm$ 1,09
	Día 20	7,30 $\pm$ 1,19	6,04 $\pm$ 0,64	6,08 $\pm$ 1,28
Sem. 4	Día 24	7,26 $\pm$ 1,80	5,84 $\pm$ 1,16	6,28 $\pm$ 1,09
	Día 27	7,30 $\pm$ 1,93	5,68 $\pm$ 0,82	6,23 $\pm$ 0,79

**Tabla 80:** Valores medios y desviación típica de las concentraciones de telopéptido carboxiterminal de colágeno tipo I ( $\mu\text{g/L}$ ) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo. (<sup>†</sup>) diferencias significativas de la dieta aniónica respecto a la dieta control y a la aniónica, (\*) diferencias significativas de la dieta aniónica respecto a la control ( $p < 0,05$ ). Existe una tendencia ( $p < 0,1$ ) hacia diferencias estadísticas entre la dieta aniónica y la catiónica los días 3 y 20 de experimento y entre la aniónica y la control el día 27, aunque no se alcanza el nivel de significación del 95%

TCTI					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	71,637	2	35,818	22,914	0,000
Muestreo	4,691	7	0,670	0,429	0,884
Dieta*Muestreo	7,871	14	0,562	0,360	0,984

**Tabla 81:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la concentración plasmática de TCTI

La gráfica que podemos ver a continuación refleja las concentraciones de TCTI respecto al tiempo de consumo de las dietas.



**Gráfica 13:** Representación de la concentración de TCTI (µg/L) respecto al tiempo para cada una de las tres dietas. Las líneas representan: (♦) dieta catiónica, (♦) dieta control, (♦) dieta aniónica. (\*) diferencias significativas entre dieta aniónica y control, (\*) diferencias significativas de la dieta aniónica respecto a la catiónica y a la control ( $p < 0,05$ )

Tal y como se muestra en la gráfica, no aparece influencia del tiempo de aplicación de las dietas en las concentraciones de TCTI, en cambio el tipo de dieta presenta un efecto significativo en los niveles de dicho parámetro.

En el grupo de animales que recibió la dieta aniónica las concentraciones de este marcador de resorción ósea fueron mayores, alcanzando significación estadística los días 10 (respecto

al grupo alimentado con la ración control) y 17 de experimento (respecto a los grupos que recibieron la dieta catiónica y la control).

### 5.6.2. FOSFATASA ALCALINA DE ORIGEN ÓSEO (FAO)

Siguiendo el esquema empleado hasta el momento, en la tabla 82 ofrecemos los resultados obtenidos para la FAO en forma de media  $\pm$  desviación típica.

FAO				
TOMA DE MUESTRAS		D. ANIÓNICA	D. CONTROL	D. CATIÓNICA
Sem. 1	Día 3	9,41 $\pm$ 1,82	10,68 $\pm$ 1,13	10,45 $\pm$ 1,87
	Día 6	9,26 $\pm$ 1,23	9,67 $\pm$ 0,70	10,05 $\pm$ 0,86
Sem. 2	Día 10	9,87 $\pm$ 1,51	9,19 $\pm$ 2,11	9,69 $\pm$ 2,38
	Día 13	10,82 $\pm$ 1,34	10,23 $\pm$ 1,31	10,57 $\pm$ 1,56
Sem. 3	Día 17	9,18 $\pm$ 1,12	9,10 $\pm$ 1,83	9,24 $\pm$ 1,99
	Día 20	9,72 $\pm$ 2,03	9,57 $\pm$ 1,21	10,95 $\pm$ 2,17
Sem. 4	Día 24	10,50 $\pm$ 1,58	10,94 $\pm$ 3,23	10,56 $\pm$ 2,28
	Día 27	9,26 $\pm$ 1,86	9,41 $\pm$ 1,82	10,90 $\pm$ 2,28

**Tabla 82:** Valores medios y desviación típica de las concentraciones de fosfatasa alcalina de origen óseo (U/L) para cada una de las dietas (aniónica, control y catiónica) según el día de muestreo

A continuación reflejamos la influencia de las dos variables independientes “tipo de dieta” y “día de muestreo” y de la interacción entre ambas sobre la variable dependiente “actividad de fosfatasa alcalina de origen óseo”.

FAO					
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Dieta	13,804	2	6,902	2,127	0,122
Muestreo	43,112	7	6,159	1,898	0,071
Dieta*Muestreo	33,530	14	2,395	0,738	0,735

**Tabla 83:** Efectos principales de las variables independientes (dieta y muestreo) e interacción entre las dos sobre la actividad de la FAO

A lo largo de nuestro estudio no detectamos influencia del tipo de dieta, ni del tiempo de administración de las mismas sobre la fosfatasa alcalina de origen óseo.





Discusión



## 6. DISCUSIÓN

Estructuraremos la discusión siguiendo el mismo orden de subapartados que hemos empleado en el bloque de resultados con el fin de facilitar la comprensión de este trabajo.

Es importante tener en cuenta que hemos denominado a las dietas según el componente de la ración que hemos adicionado, de tal manera que la dieta control fue un pienso comercial de alta gama que no estuvo sometido a ningún tipo de modificación; sobre dicha ración base hemos actuado añadiendo cloruro amónico (dieta aniónica) o carbonato potásico (dieta catiónica).

Antes de introducirnos de pleno en la discusión, debemos aclarar que decidimos realizar la toma de muestras tras un ayuno prácticamente de 23 horas, tal como mencionamos en el apartado correspondiente, con el fin de minimizar la influencia directa de la ingesta sobre el equilibrio ácido-básico orgánico. Tras el consumo de alimento se produce un estado de alcalosis metabólica relativa, la cual ha sido denominada como “marea alcalina”, este fenómeno tiene lugar porque las células parietales del estómago liberan cloro y captan bicarbonato que a su vez pasa al líquido extracelular. La compensación de este hecho incluye un incremento en la excreción de bicarbonato urinario, provocando una elevación transitoria del pH de la orina entre las 2 y las 12 horas después del consumo de alimento (NRC, 2006).

Existen muchos factores nutricionales que pueden afectar al equilibrio ácido-base, entre los que destacan el contenido proteico de los alimentos así como su composición en aminoácidos azufrados, el origen (animal o vegetal) y la capacidad del intestino para absorber diferentes combinaciones de nutrientes (NRC, 2006). Por este motivo y con el fin de evitar toda esta variabilidad, hemos trabajado de forma única con variaciones en la DED para lo cual hemos empleado el mismo alimento de base suplementándolo con sales aniónicas y catiónicas.

### 6.1. EFECTOS DE LAS DIETAS EN EL ESTADO ÁCIDO-BÁSICO

Para el estudio del estado ácido-básico en perros alimentados con dietas con diferente DED hemos empleado tanto el método tradicional como el método cuantitativo.

Tradicionalmente el balance ácido-básico ha sido evaluado a través de la ecuación de Henderson-Hasselbalch para caracterizar cuatro disturbios primarios (acidosis y alcalosis respiratoria, acidosis y alcalosis metabólica), además de forma rutinaria se realizaba el cálculo del *anion GAP* con el fin de realizar una estimación de los aniones no medibles. Este método presenta el inconveniente de que no permite describir de forma precisa los disturbios que aparecen en el equilibrio ácido-básico, puesto que es un procedimiento más descriptivo que cuantitativo, además el *anion GAP* representa la carga aniónica neta sin tener en cuenta las variaciones inducidas por las proteínas (la albúmina y las globulinas) y el fosfato, por lo que este método resulta inapropiado al cuantificar la carga de iones fuertes no medibles en aquellos animales con alteraciones de alguno de estos parámetros (Constable y Stämpfli, 2005).

El primer parámetro que hemos estudiado es el pH en sangre arterial y hemos encontrado que durante prácticamente todo el periodo de experimental el pH presenta valores ligeramente inferiores en el grupo de animales alimentado con la dieta aniónica. Pero a pesar de que detectamos diferencias estadísticamente significativas en tres puntos (día 10, 20 y 24), hay que destacar que los valores obtenidos para las tres dietas se encuentran dentro de los rangos de normalidad aportados por la mayoría de los autores para sangre arterial (Bailey y Pablo, 1998; DiBartola, 2002). Analizando nuestros resultados resulta evidente que la media de los valores de pH que hemos obtenido para las tres dietas es inferior a la media descrita por estos autores, ya que en la mayoría de las revisiones consultadas describen un valor medio para el pH en sangre arterial en la especie canina de 7,40 (Robertson, 1989; Bailey y Pablo, 1998; DiBartola, 2002). Una posible justificación que podríamos dar a este relativamente bajo pH arterial pasaría por considerar que se haya producido una mezcla con sangre venosa en el momento de la extracción debido a la gran proximidad anatómica entre la arteria y la vena femoral, hecho poco probable en nuestro caso ya que si nos vamos a la tabla nº 26, donde aparecen los resultados para la  $pCO_2$ , vemos como sus valores se corresponden con sangre arterial. Teniendo en cuenta este hecho y que el equipo utilizado por nosotros para este tipo de análisis (gasómetro i-STAT®, Sensor Devices, Waukesha, EEUU) fue validado en el 2002 por Verwaerde *et al.* para su empleo en perros, no podemos aportar una explicación diferente a la composición intrínseca de la dieta control sobre la cual actuamos nosotros posteriormente para inducir las variaciones en la DED, como la responsable de estos valores de pH por debajo de la media.

Respecto a la  $p\text{CO}_2$  podemos observar (tabla 26) como algunos de nuestros valores se encuentran por debajo del intervalo de referencia aportado por Robertson (1989), mientras que se localizan dentro de los límites normales descritos por Bailey y Pablo (1998) y DiBartola (2002) pero cercanos al valor inferior del intervalo. No obstante nuestros resultados se encuentran próximos a los obtenidos por Ilkiw *et al.* (1991), Aguilera-Tejero *et al.* (1997) y Estepa *et al.* (1999b). Este último grupo de investigadores consideraron que la disminución de la  $p\text{CO}_2$  media que obtuvieron en su estudio era debida a la falta de preparación previa de los animales, ya que los ejemplares que no son adiestrados previamente para la obtención de sangre arterial presentan una tendencia hipocápnica en relación a la hiperventilación asociada al estrés que supone la contención del animal para la recogida de las muestras. En nuestro caso, los perros beagle con los que trabajamos a lo largo de este protocolo experimental habían sido sometidos durante los meses anteriores al comienzo del experimento a extracciones de sangre arterial de forma regular, por lo que consideramos que este factor se encuentra minimizado en gran medida. Además teniendo en cuenta que los valores de pH obtenidos en sangre arterial mostraban, del mismo modo, disminuciones claras respecto al valor medio aportado por otros autores, consideramos que esta disminución de la  $p\text{CO}_2$ , asociada a la administración de las tres dietas, se trata de una compensación respiratoria y la consideramos “parcial”, puesto que el hecho de que se produzca una disminución de la  $p\text{CO}_2$  no evita el descenso del pH.

En lo referente a la evolución de la  $p\text{CO}_2$  en relación a la administración de las tres dietas sólo se hacen evidentes diferencias estadísticamente significativas en dos puntos (días 20 y 27 de muestreo), además de esta circunstancia prácticamente a lo largo de todo el estudio la  $p\text{CO}_2$  presenta valores medios inferiores en el grupo de animales alimentados con la dieta aniónica respecto al grupo que recibió la alimentación catiónica. Esta reacción se podía esperar en cierta medida puesto que la ingestión de las sales aniónicas conduce a la entrada de una gran cantidad de iones con carga negativa (en nuestro caso  $\text{Cl}^-$ ) en la sangre, lo que provoca una acumulación de protones, los cuales deben ser amortiguados por el bicarbonato y otros sistemas tampón del organismo. El dióxido de carbono producido por la reacción de los protones y del bicarbonato se elimina a través de los pulmones, además se suma el papel del centro de la respiración que, ante la detección de esta tendencia a la acidosis metabólica, fuerza la eliminación de  $\text{CO}_2$  (Guyton y Hall, 2006b) produciéndose una compensación respiratoria, en este caso, parcial.

Los valores que hemos encontrado para el bicarbonato (tabla 28) se encuentran por debajo del rango de referencia establecido por Robertson en 1989, pero se sitúan dentro de los intervalos que nos ofrecieron Ilkiw *et al.* (1991), Aguilera-Tejero *et al.* (1997), Estepa *et al.* (1999b), Bailey y Pablo (1998) y DiBartola (2002). Debemos destacar que para este parámetro ocurre lo mismo que hemos comentado para la  $p\text{CO}_2$ . La tendencia general de los valores de  $\text{HCO}_3^-$  y de  $\text{CO}_2\text{t}$  es a la baja, es decir, se encuentran próximos al límite inferior del intervalo de normalidad. Este hallazgo es compatible con la tendencia que producen las tres dietas administradas hacia la acidosis metabólica, puesto que este proceso se caracteriza por la disminución del bicarbonato del LEC que produce el acúmulo de ácidos en el organismo. En el caso de la comparación entre las tres dietas podemos observar que la mayoría del tiempo los valores obtenidos para este parámetro en el caso de la dieta aniónica son menores a los que aparecen en el caso de la dieta catiónica y la control, esto era esperable puesto que el bicarbonato orgánico ha de tamponar el aumento de los hidrogeniones, además hay que destacar que las diferencias de la dieta aniónica son significativas a lo largo de todo el periodo experimental, mientras que no aparecen diferencias entre la dieta catiónica y la control.

El exceso de bases (tabla 32) se emplea para evaluar el componente no respiratorio de los desórdenes ácido-básicos. Incrementos importantes del EB indican una contribución no respiratoria a la alcalosis mientras que disminuciones importantes del mismo señalan una contribución no respiratoria a la acidosis (Russell *et al.*, 1996). En relación a este parámetro la mayoría de los autores definen el rango normal para la especie canina entre -4 y +4 aunque Aguilera Tejero *et al.* (1997) y Estepa *et al.* (1999b) describen unos valores medios inferiores ( $-2,78 \pm 0,45$ ) que justificaron como una tendencia a la acidosis metabólica en un intento por compensar la alcalosis respiratoria debida a la hipocapnia secundaria al estrés generado durante la extracción de sangre arterial. En nuestro caso los valores obtenidos para el EB son claramente inferiores a los obtenidos por estos autores para las tres dietas, de hecho, la mayor parte de nuestros resultados presentan un valor inferior a -4 señalando la tendencia hacia un estado de acidosis metabólica en los tres grupos.

Además de esta visión general, en el momento en el que pasamos a comparar los tres grupos entre sí, podemos observar como los animales que consumen la dieta aniónica presentan durante todo el ensayo unos valores de EB inferiores a los que consumen la dieta catiónica, al igual que sucedía con las concentraciones de bicarbonato y con el  $\text{CO}_2$  total. Nosotros explicamos estos resultados en base a que consideramos que los tres grupos

presentan una tendencia hacia la acidosis metabólica, esta tendencia se pone de manifiesto de una forma más evidente en aquellos animales alimentados con la dieta aniónica.

De lo analizado hasta este momento, podemos resumir que en nuestro estudio la tendencia hacia la acidosis, que es mayor en el grupo de animales que consumen la dieta aniónica, se acompaña de una bajada de los parámetros indicadores del componente metabólico (bicarbonato y EB) y respiratorio ( $p\text{CO}_2$ ) del equilibrio ácido-base. En base a estas observaciones, podemos plantear la hipótesis de que las dietas con baja DED originan una tendencia de mayor entidad hacia la acidosis metabólica que se acompaña con una tendencia a la alcalosis respiratoria compensatoria en perros beagle.

El método tradicional incluye también el análisis del *anion GAP* que permite profundizar en el origen de la acidosis metabólica. A lo largo de nuestro estudio los valores de *anion GAP* (tabla 34) se han encontrado en todo momento dentro de los valores de referencia aportados por Polzin *et al.* (1982). Como hemos visto en el apartado de resultados, en nuestro trabajo, tras la aplicación del análisis de varianza de dos vías detectamos que las dietas ejercen una influencia estadísticamente significativa sobre el *anion GAP*, aunque estas diferencias no se hacen patentes al aplicar el Test de Tukey, de hecho, ni tan siquiera detectamos una tendencia hacia la significación estadística. Debemos destacar que en el caso de hacerse evidentes las diferencias en el citado test, la dieta aniónica provocaría disminuciones significativas de este parámetro y no aumentos, por lo que el mayor grado de acidosis que aparece como consecuencia de la administración de esta dieta no se debe a la mayor presencia de aniones no medibles (especialmente sulfatos), ni de ácidos orgánicos (ácido láctico o cetoácidos).

Si tenemos en cuenta que en nuestro estudio los animales con tendencia a la acidosis metabólica presentan valores normales de *anion GAP*, para su correcta interpretación, debemos comparar los cambios en las concentraciones de cloro y bicarbonato. Como comentaremos en la sección “efecto de las dietas sobre los minerales plasmáticos” de esta discusión, los perros alimentados con la dieta aniónica presentaron unos niveles de cloro significativamente más elevados que aquellos animales alimentados con la catiónica y la control, por lo que, teniendo en cuenta dichos incrementos en la cloremia sin que se produzcan variaciones del *anion GAP* podemos deducir que la entidad del aumento de las concentraciones de cloro es similar a la reducción observada en las concentraciones de bicarbonato. En base a estas observaciones y el análisis conjunto de todos los datos expuestos hasta el momento podemos decir que la adición de cloruro amónico sobre la dieta

control provoca una tendencia hacia la acidosis metabólica que cursa sin modificaciones en el *anion GAP*, siendo por tanto hiperclorémica. La tendencia general a la acidosis que hemos observado también en los otros dos grupos la intentaremos explicar, a continuación, mediante el análisis del método cuantitativo.

Como ya hemos comentado en el apartado de “revisión bibliográfica”, el análisis cuantitativo de Stewart ofrece una visión totalmente diferente al modelo tradicional, ya que implica la aplicación de principios físico-químicos fundamentales en la valoración del equilibrio ácido-base. Este modelo asume que las concentraciones de ión hidrógeno e ión bicarbonato son variables dependientes sujetas fundamentalmente a las variaciones de 3 variables independientes: la diferencia de iones fuertes (DIF), la concentración de ácidos débiles no volátiles ( $A_{TOT}$ ) y de la  $pCO_2$ .

Del modelo original planteado por Stewart se han ido publicando sucesivas simplificaciones para su utilización en la clínica de pequeños animales. En la mayoría de los casos se trata de extrapolaciones de las fórmulas empleadas en medicina humana y, por ello, su uso es muy criticado por algunos autores. Nosotros hemos empleado en este trabajo de tesis doctoral los protocolos y fórmulas simplificados publicados por Leith (1991) y de Morais (1992) para la evaluación de los desórdenes ácido-básicos no respiratorios basados en la teoría de Stewart (1983). Estos protocolos han sido empleados con éxito en veterinaria en diferentes artículos como los de Whitehair *et al.* (1995); Russell *et al.* (1996) y Bailey y Pablo (1998). La elección de este método la hemos basado en que la principal variación que encontramos en nuestro trabajo es en la variable independiente diferencia de iones fuertes (DIF) y este algoritmo nos permite estudiar a su vez los diferentes parámetros que contribuyen a las variaciones de la DIF.

El método empleado por Aguilera-Tejero *et al.* (1997) y Estepa *et al.* (1999b) en perros fue descrito por Fencel y Leith (1993) y aunque bajo nuestro punto de vista nos aporta más fiabilidad en el cálculo de la DIF, no nos permite desglosar a que pueden ser debidas sus variaciones.

Por otro lado Constable (1997) publicó un modelo simplificado de la teoría de los iones fuertes que al parecer se adapta mucho mejor que los modelos extrapolados de humana a la medicina veterinaria, pero resulta demasiado complejo y además en este trabajo no se han tenido en cuenta muchas de las variables que incluye.



La gran limitación del método cuantitativo de iones fuertes reside en el cálculo del valor exacto para la DIF, puesto que su determinación requiere la identificación y medida de todos los iones fuertes presentes en el plasma. El método algorítmico que nosotros hemos empleado simplifica en gran medida este concepto y lo calcula sustrayendo a la concentración de sodio media normal (148 en el caso de los perros) la concentración de cloro corregido. Esta corrección de la concentración del cloro se realiza puesto que mediante este modelo se tienen en cuenta las alteraciones en el agua libre.

Russell *et al.* (1996) fijaron el valor de DIF normal para perros en 36, mientras que Bailey y Pablo (1998) lo establecieron un punto por debajo. En nuestro trabajo (tabla 36) todos los grupos estudiados presentaban una DIF inferior a 35. En los grupos alimentados con la dieta catiónica y la control la DIF es ligeramente inferior a dicho valor, pero aún así no se trata de un valor despreciable, en cambio en el grupo de animales alimentados con la dieta aniónica la DIF desciende significativamente (Gráfica nº 4). Por lo tanto, los tres grupos contenidos en nuestro estudio presentan una tendencia a la acidosis metabólica y esta observación coincide con los hallazgos encontrados durante la valoración del método tradicional.

Los cambios en la DIF pueden estar provocados por modificaciones en el agua libre, por cambios en el cloro corregido o por alteraciones en la concentración de los aniones no medibles.

En cuanto a las variaciones en el agua libre, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos y además todos los valores obtenidos oscilan entre 0 y -1 (tabla 38), con lo que podemos considerar las disminuciones respecto a 0 despreciables. Como consecuencia de los datos aportados por este análisis podemos establecer que, en nuestro grupo experimental, no existe una acidosis dilucional por exceso de agua libre.

En lo referente a las variaciones en los aniones no medibles (tabla 42) no hemos detectado diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos y vemos que los tres presentan una tendencia hacia la acidosis metabólica orgánica. En la bibliografía no hemos encontrado ninguna referencia que asocie el ayuno de corta duración con la aparición de ácidos orgánicos en sangre, por lo que nosotros consideramos que este hallazgo puede deberse a un efecto intrínseco a la dieta control que estamos administrando. Como ya hemos mencionado a lo largo de este trabajo, la composición de la dieta y el metabolismo de nutrientes cuentan con efectos significativos en la generación de ácidos y de bases en el

organismo. Un ejemplo muy claro lo tenemos en dietas que contienen proteínas ricas en aminoácidos azufrados, puesto que el catabolismo de estos aminoácidos aparece estrechamente asociado a la liberación de iones hidrógeno en conjunto con la producción de aniones sulfato. Otro tipo de moléculas cuyo catabolismo está asociado con la acidificación orgánica son, por ejemplo, las fosfoproteínas y los fosfolípidos presentes en la dieta (NRC, 2006). De todos modos, si comparamos los resultados obtenidos para este parámetro con los obtenidos para el *anion GAP*, podemos observar que en el caso de este último no habíamos detectado un aumento de los aniones no medibles como responsables de la tendencia a la acidosis producida por las tres dietas y tampoco se producían diferencias significativas claras entre los tres grupos. Este hecho, puede ser debido a que la contribución de los aniones no medibles en el método cuantitativo ha sido calculada a partir de la variable “variaciones en la albúmina” y como sabemos por los artículos publicados por Constable (1997, 1999, 2000) y Constable y Stämpfli (2005) este método extrapolado de humana no es muy fiable en la determinación de la variable  $A_{TOT}$ , ya que se sobreestima la participación de las proteínas en la inducción de desequilibrios ácido-básicos en el caso concreto del perro.

La última variable que influye en la DIF son los cambios en el cloro corregido, como podemos observar en la gráfica nº 5, el grupo alimentado con la dieta aniónica presenta una disminución estadísticamente significativa en la variación del cloro corregido y hemos visto que disminuciones de este parámetro respecto a cero son compatibles con la presencia de una acidosis metabólica hiperclorémica. De todos modos, si analizamos de forma conjunta las tres dietas empleadas vemos que tanto la control como la alcalina presentan también una ligera tendencia a generar acidosis metabólica hiperclorémica pero de mucha menor entidad. Nosotros creemos que esta tendencia a la acidificación, que aparece también en asociación a la dieta control y a la catiónica, puede deberse a que la dieta control administrada contiene un poco más del doble de cloro que de sodio, mientras que la AAFCO (1998) recomienda que la cantidad de cloro añadida a las dietas caninas debería ser 1,5 veces superior a la de sodio, por lo que quizás sea este pequeño desequilibrio dietético el que esté provocando el fenómeno observado.

Otra de las variables independientes que determina el equilibrio ácido-base orgánico es la  $A_{TOT}$ , que se encuentra influida sobre todo por variaciones de las proteínas plasmáticas, fundamentalmente de la albúmina, y del fósforo. Debemos señalar que no hemos hallado diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros entre los grupos, con lo cual

no vamos a ahondar más en esta variable puesto que no estamos trabajando con el método más adecuado para su estudio.

La última variable independiente contemplada en este modelo es el  $p\text{CO}_2$  que ya lo hemos discutido en el análisis del método tradicional, simplemente recordar que en el caso de las tres dietas se producía una tendencia a la alcalosis respiratoria en un intento por compensar la tendencia hacia la acidosis metabólica presente. Además la  $p\text{CO}_2$  alcanzaba valores estadísticamente inferiores en algunos de los días de muestreo del grupo alimentado con la dieta aniónica, que estaban asociados con la presencia de una alcalosis respiratoria de mayor entidad relacionada con el hecho de que en este grupo la tendencia hacia la acidosis metabólica era mayor. De todos modos, en ninguno de los casos se lograba una compensación respiratoria completa puesto que se pone de manifiesto una disminución del pH en sangre arterial.

Como resumen a todo el desarrollo del método cuantitativo hemos de decir que existe una tendencia a la acidificación por parte de las tres dietas, y que esta acidificación es significativamente más evidente en el caso de los animales alimentados con la dieta aniónica. Evaluando las posibles causas de esta tendencia a la acidificación encontramos que la influencia de la  $A_{\text{TOT}}$  y de las variaciones de agua libre son despreciables, mientras que las tres dietas conducen a un ligero incremento los aniones no medibles pero sin diferencias estadísticas entre las mismas. Por último el factor que más influencia tiene sobre la DIF, en nuestro caso, son las variaciones que aparecen en el cloro, siendo este electrolito el que conduce sin duda a la mayor tendencia que presenta la dieta aniónica a la acidificación. Además tanto la dieta control como la catiónica también muestran una ligera predisposición a provocar acidosis metabólica hiperclorémica.

A lo largo del análisis del equilibrio ácido-básico no hemos encontrado ninguna influencia de la variable “día de muestreo” sobre los parámetros empleados, hay que tener en cuenta que nuestro primer día de muestreo en todos los grupos coincidió con el tercer día en el que los perros estaban ingiriendo la dietas, por lo que deducimos que los cambios en los parámetros ácido-básicos son prácticamente inmediatos. Esta rápida respuesta ante la ingesta de una cantidad elevada de aniones ya fue descrita por Goff y Horst (1998) en vacuno, quienes hallaron que el descenso del pH urinario se producía a las 16 horas de administrar una alimentación acidificada y a las 24 horas describieron un cambio de la misma naturaleza en el pH sanguíneo.

Por otra parte debemos considerar, a la hora de comparar nuestros resultados con los obtenidos en otros protocolos experimentales, la enorme diversidad de niveles de DED y de los tiempos de administración empleados en otras especies. Por tanto no es tarea fácil confrontar las variaciones del equilibrio ácido-base entre los diferentes experimentos. En nuestro caso, esta comparación resulta todavía más dificultosa debido a que tenemos la complicación añadida de que el único estudio realizado en perros en que se aplicó este concepto (Kealy *et al.*, 1993) no valoró sus efectos sobre el equilibrio ácido-base.

Tal como ya hemos comentado durante la revisión bibliográfica, existen estudios realizados en perros en los que diversos autores han valorado los efectos del empleo de cloruro amónico como fármaco para acidificar la orina. Por lo general, estos trabajos utilizan dosis mucho más elevadas que la empleada por nosotros, puesto que buscan un efecto farmacológico y, además, no lo combinan con la de la dieta lo que permite estudiar los efectos de fármaco desde su momento de administración al no presentar interferencias con la “marea alcalina”. Lo más interesante que podemos extrapolar de estos estudios es que en ellos se ha comprobado que la administración de cloruro amónico a dosis farmacológicas presenta capacidad para provocar acidosis metabólica y acidificación urinaria (Magner *et al.*, 1988; Shaw, 1989; Schober, 1996). La cantidad de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  que nosotros hemos escogido para añadir a la dieta ha sido mucho más conservadora, con el fin de mantenernos dentro abanico de DED disponibles en los piensos existentes en el mercado.

La mayoría de los trabajos realizados en porcino y en aves están de acuerdo en que el pH, el bicarbonato y el EB aumentan cuando se incrementa la DED de la ración y viceversa (Mongin y Saveur, 1977; Mongin, 1981; Halley *et al.*, 1987; Patience *et al.*, 1987; Haydon *et al.*, 1990; Patience y Chaplin, 1997; Budde y Creshaw, 2003; DeRouchey *et al.*, 2003; Gezen *et al.*, 2005). Realmente esta afirmación coincide con nuestros resultados, puesto que nosotros también hemos encontrado esa tendencia general aunque no hemos detectado diferencias estadísticamente significativas entre la dieta catiónica y la control. La mayoría de los autores citados anteriormente han descrito la existencia de un aumento lineal del pH y de la reserva alcalina con el aumento de la DED, en nuestro caso no podemos demostrar este tipo de comportamiento ya que deberíamos trabajar con más niveles de DED y con mayores diferencias entre las mismas, ya que es lógico pensar que la linealidad se pierda al trabajar con DED muy altas o muy bajas, como ya se ha demostrado en vacuno (Roche *et al.*, 2003a), donde se ha visto que por encima de un valor de DCAD mayor a 520 mEq/kg el pH sanguíneo parece no variar.

El  $\text{CO}_2$  total normalmente muestra los mismos cambios que la concentración de bicarbonato, por este motivo en los estudios en los que se ha incluido disminuye con DED bajas y aumenta con DED altas siguiendo el mismo patrón que el bicarbonato y que el EB; en nuestro estudio podemos observar la misma respuesta no apareciendo diferencias estadísticamente significativas entre la dieta catiónica y la control.

En cuanto a la participación de los mecanismos respiratorios en la compensación del equilibrio ácido-básico cuando se administran dietas acidificantes, existen trabajos llevados a cabo en porcino en los que se ha detectado la aparición de una compensación respiratoria parcial (Patience y Chaplin, 1997; Budde y Creshaw, 2003; DeRouchey *et al.*, 2003), mientras que otros no la han detectado, sosteniendo que la acidosis metabólica que se origina como consecuencia de la ingestión de una ración de baja DED es amortiguada por completo por los riñones sin afectar a la actividad respiratoria (Patience y Chaplin, 1987; Haydon *et al.*, 1990). Esta misma discrepancia la hemos encontrado también al analizar trabajos realizados en ganado vacuno, donde existen autores que han constatado un descenso significativo de la  $\text{pCO}_2$  en sangre (Tucker *et al.*, 1992; Joyce *et al.*, 1997; Gant *et al.*, 1998; Schonewille *et al.*, 1999), mientras otro grupo de experimentos detallan como la acidosis metabólica de la dieta es compensada totalmente por mecanismos no respiratorios (Van Mosel *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 1994; Vagnoni y Oetzel, 1998; Roche *et al.*, 2003a). Por su parte en aves, no se ha documentado en ningún trabajo la presencia de compensación respiratoria. Nosotros consideramos que esta posible discrepancia entre estudios se puede deber el empleo de diferentes DED en los distintos trabajos, al uso de diferente tipo de sangre (arterial o venosa) y al manejo de la muestra, ya que la hipótesis propuesta por algunos investigadores citados anteriormente de que la aparición de compensación respiratoria aparece en aquellos casos en los que la DED se reduce tanto que sobrepasa la capacidad de amortiguación renal se cumple en algunos casos pero no en todos, y una excepción la encontramos en el trabajo de Patience *et al.* (1987) llevado a cabo en cerdos, en el cual trabajando con DED de -85 mEq/kg no llegan a observar compensación respiratoria.

Por nuestra parte, y por las razones que ya hemos comentado, consideramos que la variación de la DED en dietas administradas en perros conduce a la aparición de una respuesta de compensación respiratoria parcial, tanto en la dieta con la DED más baja (0 mEq/kg) donde se alcanzan valores de  $\text{pCO}_2$  significativamente inferiores, como con la dieta control y catiónica puesto que presentan una ligera tendencia hacia la acidificación.

El último parámetro analítico que nos resta por comentar, en este apartado, es el pH urinario. En la sección de resultados hemos constatado como durante la mayor parte del periodo experimental los animales alimentados con la dieta aniónica presentan un pH urinario más bajo que los alimentados con las otras dos dietas, apareciendo diferencias estadísticamente significativas durante los días 3 y 20 de muestreo entre aniónica y la catiónica. Aunque en nuestro estudio no hemos valorado parámetros adicionales para la intentar clarificar el tipo de actuación renal que se está produciendo, parece probable que esté teniendo lugar la respuesta renal típica ante un estado de acidosis metabólica, es decir, un aumento de la reabsorción tubular de bicarbonato, sumado a un incremento de la producción y excreción de amonio que conduce al aumento de la excreción neta de ácido en orina. Este tipo de actuación renal se ha demostrado al disminuir la DED de la ración tanto en ganado vacuno (Goff y Horst, 1997; Vagnoni y Oetzel, 1998 y Schoenwille *et al.*, 1999) como en porcino (Budde y Crenshaw, 2003; DeRouchey *et al.*, 2003). Respecto al pH urinario nos llama la atención la rápida actuación de la dieta aniónica, aunque Goff y Horst en 1998, tal como mencionamos anteriormente, ya habían descrito en vacuno una disminución del pH urinario a las 16 horas de comenzar con la administración de las dietas. Nosotros no esperábamos que apareciese ningún cambio en etapas tan iniciales, puesto que Senior (1984), trabajando con perros a los que administraba cloruro amónico como acidificante urinario, no constató disminuciones del pH en orina hasta pasados 4 días del comienzo de la administración. En nuestro caso hemos detectado su descenso a las 48 horas; de todos modos el pH de la orina permaneció en todo momento dentro del rango fisiológico para la especie (5-7,5).

Nosotros consideramos que la rápida respuesta renal que aparece en nuestro estudio y que coincide, como ya hemos mencionado con lo encontrado por Goff y Horst (1998) en vacuno, es un intento del riñón de tratar de compensar los cambios en el equilibrio ácido-básico provocados por la dieta antes de que se vea afectado el pH sanguíneo. Con el tiempo esta respuesta renal puede llegar a resultar insuficiente siendo este el motivo de los cambios que aparecen con posterioridad en el pH.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, aunque resulta evidente que la administración de la dieta aniónica produce una disminución del pH urinario que se hace significativa en dos puntos, hay que tener en cuenta que la dispersión de los datos en los tres grupos fue muy grande (gráfica 6) y en ningún momento se produjo una correlación con las variaciones del pH arterial. Estos resultados corroboran los obtenidos por nuestro equipo investigador en un trabajo previo en el que los animales fueron alimentados con dietas

comerciales de diferente DED. En dicho estudio pudimos comprobar que la dieta de menor DED cursaba, del mismo modo, con una disminución del pH urinario, pero en ningún momento se produjo una correlación positiva entre el pH en sangre arterial y en orina. Por todo ello, concluimos en ese estudio que el pH urinario no es un buen indicador de los cambios que se producen en el pH arterial como resultado de la administración de dietas, en principio, acidificantes (Rodríguez *et al.*, 2007a).

Para finalizar este apartado, nos gustaría destacar que en la mayoría de los trabajos realizados en diferentes especies (aves, vacas y cerdos) aplicando DED distintas, todos los valores de los parámetros ácido-básicos se mantuvieron siempre dentro del intervalo de normalidad para la especie. Nosotros en nuestro estudio hemos corroborado esta misma actuación, hecho que refleja la enorme importancia fisiológica que representa el mantenimiento del equilibrio ácido-básico para la supervivencia.

A pesar de las modificaciones que acontecen en los distintos parámetros del equilibrio ácido-básico no detectamos ninguna afectación de la apariencia de los animales, ni modificaciones del apetito que nos pudieran indicar una mejoría o empeoramiento en su estado metabólico. Es más, indistintamente del tipo de dieta administrada todos los animales consumían la ración en un breve periodo de tiempo y con gran avidez sin presentar en ningún momento vómitos ni diarrea; lo que nos hace pensar que se adaptaron perfectamente a la suplementación con sales. De modo que, el efecto de disminución de la palatabilidad que se ha observado en otras especies (Yen *et al.*, 1981; Patience *et al.*, 1987; Park *et al.*, 1994) no lo hemos detectado en perros, al menos a las dosis con las que hemos trabajado.

## **6.2 EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE LOS MINERALES Y ELECTROLITOS SANGUÍNEOS**

Bajo este epígrafe englobaremos el estudio del efecto de variaciones en la DED sobre los electrolitos (sodio, potasio y cloro) y los minerales (calcio, fósforo y magnesio) sanguíneos, aunque en realidad todos ellos podrían agruparse bajo la denominación de minerales.

### **6.2.1. SODIO, POTASIO Y CLORO**

Los cambios originados por la DED en la concentración sanguínea de sodio, potasio y cloro los consideraremos de forma conjunta en este apartado.

El sodio (tabla 50) se mantuvo invariable a lo largo de todo el periodo experimental, no observándose diferencias estadísticamente significativas con el tipo de dieta según el día de muestreo sobre este electrolito. En nuestro experimento las tres dietas presentaban un contenido idéntico en sodio por lo que no esperábamos que se produjesen variaciones de este electrolito, por lo menos en relación con su contenido en la dieta. Recordemos que algunos investigadores han descrito la presencia de un incremento lineal en sus concentraciones con aumentos de la DED de la dieta, que atribuyeron a que dichas raciones estaban suplementadas con sales de sodio (Haydon *et al.*, 1990; Patience y Wolynetz, 1990). Aún así resulta difícil pensar que pueda llegar a producirse un incremento del sodio plasmático en relación a la elevación del sodio dietético como único mecanismo desencadenante, puesto que el organismo es capaz de percibir cambios muy pequeños en el contenido de este electrolito y actuar en consecuencia a través de la ADH que provoca una mayor retención de agua libre (acidosis dilucional) y de aumentos o disminuciones en la producción de aldosterona a nivel adrenal (DiBartola, 2002a). Este estricto control hormonal se debe a que el sodio desempeña papeles de extrema importancia en la regulación del balance ácido-base y en el control volumen extracelular (NRC, 2006).

Otros autores han descrito alteraciones de la concentración plasmática de sodio tras la administración de sales de cloro; por ejemplo Schober (1996) observó la disminución de las concentraciones de sodio plasmático en perros durante los primeros cuatro días de la administración de cloruro amónico a una dosis de 100 mg/kg dos veces al día. Este autor atribuyó este hallazgo al hecho de que la acidosis metabólica provoca un incremento en el volumen urinario excretado que se acompaña de natriuresis. Nosotros no hemos podido documentar este hecho, el motivo quizás se deba a que nuestra primera toma de muestras tras el comienzo de administración de la dieta ácida se realizó a las 48 horas y si hubiese habido un ligero descenso inicial pudiera ser que no lo hubiésemos detectado. Por otro lado, lo que parece más probable, es que en nuestro caso no haya tenido lugar ningún cambio en las concentraciones de este electrolito, puesto que el cloruro amónico se incluía en la comida y se administraba en menor cantidad que la empleada por Schober siendo en realidad la variación observada en los parámetros ácido-básicos de nuestro estudio de mucha menor entidad. Hemos de recordar que durante todo el periodo experimental nuestros animales mantuvieron todos los parámetros indicadores del equilibrio ácido-básico dentro de niveles fisiológicos, aún provocando una ligera tendencia a la acidosis, y por este motivo los



mecanismos de compensación de los que ya hemos hablado (aldosterona, ADH) han sido muy efectivos.

Además de estas dos tendencias que hemos podido observar al revisar los diferentes trabajos, es decir, que con el aumento de la DED aumentan las concentraciones plasmáticas de sodio y viceversa, existe un estudio que fue publicado por Ross *et al.* (1994), llevado a cabo en novillos, en el que documentan un descenso de la natremia a medida que los animales consumían una dieta con mayor contenido en cationes. Estos investigadores defienden la hipótesis de que a medida que se disminuye la DED de la ración se produce una mayor movilización de minerales desde el hueso, entre ellos del sodio, presentando el aumento de la DED un efecto inverso.

De todos modos, nuestros resultados están de acuerdo con los reflejados en la mayor parte de la bibliografía consultada, tanto en cerdos como en pollos, es decir, que las variaciones de la DED no presentan influencia en las concentraciones de sodio plasmáticas (Johnson y Karunajeewa, 1985; Patience y Chaplin, 1997; Dersjant-Li *et al.*, 2001b; Borges *et al.*, 2003; Gezen *et al.*, 2005), al menos con el tipo y la cantidad de sales que nosotros hemos suplementado en la dieta.

Respecto a las concentraciones de potasio (tabla 52) no hemos detectado la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre la dieta control y la catiónica, en cambio si que hemos podido observar que en los animales alimentados con la dieta aniónica los niveles de este electrolito se mantuvieron más bajos, aunque sólo se alcanzaron disminuciones significativas en los días 10, 17 y 27 de muestreo (Gráfica 7). De modo que en nuestra experiencia sólo hemos detectado diferencias significativas al aplicar una disminución de la DED pero no al aumentarla mediante la administración de carbonato potásico con la dieta.

Estos resultados difieren notablemente de los obtenidos en los trabajos consultados en cerdos y pollos, los cuales en la mayoría de los casos no detectaron diferencias significativas en las concentraciones de potasio plasmático al inducir aumentos o disminuciones en la DED (Patience y Chaplin, 1997; Dersjant-Li *et al.*, 2001b; Borges *et al.*, 2003; Gezen *et al.*, 2005). La administración de dietas en las que el aumento de la DED se conseguía a través de la suplementación de sales de potasio tampoco cursó con un aumento de la concentración de este electrolito en plasma (Jonhson y Karunajeewa, 1985) al igual que en nuestro caso.

Nosotros atribuimos nuestros resultados a la instauración, en los perros alimentados con una DED de 0 mEq/kg, de una leve acidosis metabólica prolongada en el tiempo. Como hemos

visto durante el desarrollo de la revisión bibliográfica los efectos de la inducción de una acidosis metabólica aguda difieren notablemente a los de la acidosis metabólica crónica en las concentraciones plasmáticas de potasio. De este modo, en estados acidóticos de corta duración (agudos) se produce un intercambio entre el exceso de hidrogeniones plasmáticos y el potasio celular, como defensa para evitar una caída brusca del pH sanguíneo, generando un incremento de las concentraciones plasmáticas de potasio (Toussanit y Vereerstraeten, 1962; DiBartola, 1993). En este sentido, Guyton y Hall (2006a) están de acuerdo con esta teoría pero, además, afirman que en casos de acidosis metabólica aguda los estados de hiperpotasemia se ven reforzados porque a nivel renal se produce una inhibición de la bomba Na/K localizada en la membrana basolateral de las células tubulares mediada por el incremento de  $H^+$ , este hecho disminuye la difusión del potasio hacia la luz tubular.

En casos de acidosis metabólica crónica este mecanismo fisiológico varía sustancialmente en perros y en humanos, ya que diferentes autores han constatado la presencia de hipocalemia (Marone *et al.*, 1983; Magner *et al.*, 1988) asociada a estas situaciones, algunos de ellos lo han atribuido a un aumento en la secreción de aldosterona que favorece la eliminación de  $H^+$  al líquido tubular favoreciendo a su vez las pérdidas de potasio (Magner *et al.*, 1988). Otros autores explican este fenómeno por el hecho de que la acidosis metabólica crónica inhibe la reabsorción tubular proximal de cloruro de sodio y agua, lo que aumenta el volumen de carga que llega a tramos distales, estimulando así la secreción de potasio a este nivel (Guyton y Hall, 2006a).

Finalmente acabaremos la discusión de este apartado hablando del cloro, aunque parte del comportamiento de este electrolito ya lo hemos comentado en el apartado de análisis de las variaciones del equilibrio ácido-básico. A lo largo de todo el periodo experimental no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de animales alimentados con dieta la dieta control y la dieta catiónica (tabla 54). En cambio en los perros alimentados con la dieta aniónica las concentraciones de cloro fueron mayores, llegando a existir diferencias estadísticamente significativas en los días 6, 10, 20 y 27 (Gráfica 8). De todos modos, los niveles de dicho anión se mantuvieron durante todo el periodo experimental dentro del intervalo normal de la especie aportado por Russell *et al.* (1996).

Cuando, en el apartado anterior, realizamos la caracterización del tipo de acidosis metabólica vimos que en los perros alimentados con la dieta aniónica presentaban una tendencia a la acidosis metabólica hiperclorémica de mayor entidad que la ligera tendencia hacia la acidosis metabólica que presentaban con las otras dos dietas. En condiciones normales, el

incremento en la concentración sanguínea de un anión se debe acompañar de una disminución en la excreción de protones para mantener la electroneutralidad. El exceso de protones es amortiguado por el bicarbonato con lo que su concentración se reduce y por lo tanto disminuye el pH sanguíneo (Stewart, 1983).

Los incrementos que observamos en las concentraciones plasmáticas de este electrolito podrían ser derivados a la mayor concentración del anión en la dieta, lo que coincidiría con los resultados obtenidos por Magner *et al.* (1988) que administraron cloruro amónico por vía oral en perros, aunque a dosis muy superiores a las empleadas en nuestro trabajo y también constataron el aumento de los niveles de este electrolito en plasma.

La mayoría de los trabajos revisados en aves y en porcino, en los que se administraban dietas sujetas a variaciones en la DED, se han constatado resultados similares, es decir, que la disminución de la DED de la ración cursa con un incremento de los niveles plasmáticos de cloro (Simons *et al.*, 1987; Yen *et al.*, 1981; Patience y Wolynetz, 1990; Patience y Chaplin, 1997; Dersjant-Li *et al.*, 2001b; Gezen *et al.*, 2005), lo que podría estar asociado con el mayor contenido en cloro de las dietas de menor DED. Patience y Chaplin (1997) observaron también este efecto en cerdos alimentados con una DED baja en relación a cerdos alimentados con una DED mayor, aunque el contenido en cloro de ambas dietas era el mismo. Este trabajo refleja que las concentraciones plasmáticas de cloro pueden estar influidas además de por el contenido de la dieta en este mineral, por la DED en si misma, lo que algún autor ha intentado justificar aludiendo a que el aumento de la DED provocaría un incremento en la excreción renal de cloro (Kempe-Kroonsberg, 1993).

### **6.2.2. CALCIO, FÓSFORO Y MAGNESIO**

En este apartado comentaremos el efecto que presentó la administración de dietas de diferente DED sobre las concentraciones de calcio iónico y total, fósforo y magnesio. Hay que recordar que las cantidades de dichos minerales en la ración se mantuvieron constantes en las tres dietas.

Si analizamos las concentraciones plasmáticas de calcio total, en la tabla 58, podremos observar como no se producen diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos a lo largo del periodo experimental. En cambio, si examinamos las concentraciones de calcio iónico (tabla 56) repararemos la dieta aniónica trajo consigo concentraciones de este ión más elevadas, alcanzándose diferencias estadísticamente significativas respecto a la

dieta catiónica los días 6, 10 y 24, y respecto a la dieta control el día 13. Entre la dieta catiónica y la control no aparecieron en ningún momento diferencias estadísticamente significativas.

Si comparamos los datos obtenidos con otros estudios considerados como “crónicos” por los propios autores que los realizaron en perros, en los se investigaba la respuesta del calcio sanguíneo a la acidosis, podemos ver que estos resultados coinciden con los hallados por Szenci *et al.* (1988), quienes detectaron una concentración de calcio iónico significativamente mayor, mientras que el calcio total permanecía invariable en los perros. En cambio Marone *et al.* publicaron en 1983 unos resultados opuestos a los de este trabajo, puesto que investigando un grupo control, uno con acidosis y otro con alcalosis metabólica crónica, observaron en el grupo de perros que presentaba alcalosis metabólica crónica un aumento del calcio total mientras que no detectaron diferencias significativas en las concentraciones de calcio iónico entre los tres grupos. Estos autores justificaron este hecho alegando que los animales con alcalosis metabólica crónica presentaban una reabsorción tubular de calcio superior a los animales del grupo control y ácido. Nosotros consideramos que no podemos comparar nuestros resultados con los obtenidos por Marone *et al.* puesto que la duración de su estudio fue solamente de tres días, además ellos indujeron la alcalosis por drenaje del jugo gástrico y la acidosis administrando 10 gramos al día de cloruro amónico, dosis muy superior a la empleada en nuestro trabajo.

Aunque en el estudio que acabamos de comentar previamente no se ha documentado, en la mayoría de los artículos en los que se han estudiado los efectos de la acidosis (metabólica o respiratoria) sobre las concentraciones de calcio iónico se ha observado un aumento de las mismas en diferentes especies (Oberleithner *et al.*, 1982; Szenci *et al.*, 1988; Bushinsky *et al.*, 1985b; Bushinsky *et al.*, 1992; Krapf *et al.*, 1992; Wiederkehr y Krapf, 2001), mientras que estados de alcalosis metabólica conducen a una disminución de la porción de calcio biológicamente activo (Bushinsky *et al.*, 1989; Maurer *et al.*, 2003).

Del mismo modo, el resultado encontrado de forma más habitual en los trabajos en los que se valoró el efecto de la DED sobre el metabolismo del calcio es un incremento en la concentración de calcio iónico a medida que se disminuye la DED, sobre todo, en porcino (Patience y Chaplin, 1997; DeRouchey *et al.*, 2003), en ovejas (Abu Damir *et al.*, 1991; Espino, 2003; Espino *et al.*, 2003) y en vacas (Wang y Beede, 1992; Abu Damir *et al.*, 1994; Joyce *et al.*, 1997; Schonewille *et al.*, 1999).

En lo que se refiere a las concentraciones de calcio total los resultados han sido más dispares, aunque la mayoría de los autores no reportan modificaciones en su concentración al variar la DED, como es el caso de Patience y Chaplin (1997) y Budde y Crenshaw (2003) trabajando con porcino, de Espino *et al.* (2003) en ovejas y de Abu Damir *et al.* (1994), Ross *et al.* (1994), Fauchon *et al.* (1995), Vagnoni y Oetzel (1998) y Roche *et al.* (2005) en vacuno. Existen algunos trabajos llevados a cabo en ganado vacuno en los que sí se ha documentado un incremento de la calcemia coincidiendo con la administración de sales aniónicas en la ración (Joyce *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2000). La diferencia de estos dos últimos estudios respecto al nuestro puede deberse a que nosotros no estamos variando en ningún momento el aporte de calcio en la dieta, en cambio en ganado vacuno son frecuentes los estudios en los que además de variar la DED de la ración se proporcionan mezclas ricas en calcio, puesto que se ha visto que la aplicación de DED negativas podría presentar un mayor efecto en la prevención de la hipocalcemia cuando se aplican conjuntamente con dietas enriquecidas en este mineral (Moore *et al.*, 2000).

Hay que destacar que en nuestro trabajo la administración de la dieta aniónica (suplementada con cloruro amónico) trae consigo un aumento de las concentraciones de calcio iónico, pero la dieta catiónica (suplementada con carbonato potásico) no produce el efecto contrario. Como hemos ido viendo a lo largo de la discusión no hemos logrado con la administración de la dieta, en teoría, “alcalinogénica” ningún efecto muy llamativo, pues en muy raros casos hemos constatado diferencias estadísticamente significativas respecto a la dieta control. Ni durante el planteamiento del diseño experimental, ni durante la revisión bibliográfica hemos encontrado ninguna publicación que considere cómo es la absorción intestinal del carbonato potásico en perros, pero realmente puede ser que no haya sido suficientemente efectiva. También cabe la posibilidad de que no hayamos trabajado con DED suficientemente amplias en perro, por tratarse este de un estudio pionero en esta especie. De todos modos consideramos que sería conveniente la realización de estudios que evalúen la absorción y el efecto de los diferentes tipos de sales catiónicas en perros, como los que ya existen para evaluar la actividad acidificante de las sales aniónicas en vacuno (Goff *et al.*, 2004).

Una explicación sencilla del aumento de la concentración de calcio iónico con el consumo de sales aniónicas radica en que en casos de acidosis metabólica subclínica existe una competición entre los iones hidrógeno y el calcio iónico por los puntos de unión a las proteínas plasmáticas, por ello cuando se eleva la tasa de protones se favorece la disociación

de la unión del calcio a proteína, lo que conlleva el incremento de la fracción iónica de este mineral (Segura *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2004).

En los diferentes trabajos relativos al ganado vacuno se ha planteado la hipótesis de que las sales aniónicas son capaces de aumentar la liberación de calcio desde el hueso, esta premisa estaría de acuerdo con los estudios que se llevan realizando durante años, tanto en medicina humana como en animales, y que han demostrado que los estados de acidosis moderada inducidos por la dieta conducen a la aparición de pérdidas en la mineralización ósea, o dicho de otro modo, que el hueso está implicado en el control ácido-básico de los fluidos corporales como sistema tampón (Fredeen *et al.*, 1988a y b; Eiam-ong y Kurtzman, 1994; Green, 1994).

Como hemos visto en la revisión bibliográfica, la respuesta del hueso ante estados de acidosis puede ser pasiva, mediante la disolución de la parte inorgánica del hueso en respuesta a la acidosis metabólica (Wachman y Bernstein, 1968; Domínguez y Raisz, 1979; Kunkel *et al.*, 1986; MacLeay *et al.*, 2004; Liesegang *et al.*, 2007) o activa, produciéndose en este caso también una resorción de la matriz ósea orgánica mediada por células (Arnett y Depster, 1986; Godhaber y Radadjija, 1987; Bushinsky, 1994; Bushinsky *et al.*, 1999; Bushinsky y Frick, 2000; Meghji *et al.*, 2001). En este trabajo hemos intentado averiguar si se produce destrucción o creación de la matriz orgánica a través del estudio de dos marcadores de remodelación ósea cuando administramos en perros dietas de diferente DED. Los resultados que obtuvimos en el análisis de dichos marcadores los discutiremos en el apartado correspondiente, sólo nos gustaría adelantar en este punto y con el fin de poder continuar con la discusión del calcio, que existen indicios de que a lo largo del desarrollo de nuestro estudio pueda existir una mayor resorción ósea mediada por células en el grupo de animales alimentados con la dieta aniónica.

Como podemos ver en el apartado de resultados (tabla 60) ni el tipo de dieta ni el tiempo de administración presentaron efectos significativos sobre la concentración plasmática de fósforo. Además sus concentraciones se mantuvieron en todo momento dentro del intervalo de referencia aportado por Nelson y Couto en el año 2000.

En los trabajos en los que se ha planteado el estudio de la variación de los valores de fósforo plasmáticos en el hombre y en animales con trastornos ácido-básicos se han encontrado resultados muy dispares. En hombre y en rata se ha visto que en situaciones de acidosis metabólica crónica se produce una disminución del fósforo plasmático (Gaffer *et al.*, 1980;

Krapf *et al.*, 1992; Wiederkehr y Krapf, 2001), en cambio en situaciones de alcalosis metabólica crónica no se ha podido constatar el efecto contrario, es decir, un aumento de la concentración de este mineral en sangre (Maurer *et al.*, 2003). En medicina humana, algunos investigadores han observado que en situaciones de acidosis metabólica crónica, la hipofosfatemia resultante de la disminución de la reabsorción tubular de fosfato estimula el ratio de producción del calcitriol produciéndose a su vez una disminución de la secreción de PTH secundaria al aumento de calcitriol (Kraft *et al.*, 1992; Mahlbacher *et al.*, 1999; Osther, 2006).

Marone *et al.* (1983) estudiaron la influencia de los disturbios ácido-básicos crónicos sobre la concentración plasmática de minerales en perros y sobre su excreción urinaria, no hallando diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones plasmáticas de fósforo y magnesio entre los grupos. Es necesario mencionar que este trabajo, a pesar de estar considerado como un estudio crónico, fue de muy corta duración y los métodos para inducir los trastornos ácido-básicos fueron mucho más agresivos que los empleados en nuestro estudio.

En los trabajos en los que las modificaciones de equilibrio ácido-básico fueron secundarias a modificaciones en la DED se han obtenido resultados similares. Publicaciones de especial interés para nuestra investigación son las de Patience y Chaplin (1997) y Budde y Crenshaw (2003) puesto que, aunque trabajando en porcino, emplearon dietas con DED similares a las nuestras y no observaron diferencias estadísticamente significativas de fósforo en sangre, estos resultados coinciden con los de Abu Damir *et al.* (1991) y Espino *et al.* (2003) en ovejas y con los de Johnson y Karunajeewa (1985) en aves.

En ganado vacuno es con diferencia en la especie en la que más se ha aplicado el concepto de DED y, por tanto, dónde más se ha estudiado su influencia sobre las concentraciones plasmáticas de fósforo. Los resultados de los diferentes estudios los podemos dividir en dos grupos, por un lado se encuentran aquellos investigadores que no encontraron variaciones significativas de las concentraciones de este mineral en sangre al variar la DED, como Wang y Beede (1992), Fauchon *et al.* (1995), Joyce *et al.* (1997), Vagnoni y Oetzel (1998) y Liesegang *et al.* (2007). Otros investigadores han detectado concentraciones más elevadas de fósforo en relación con la administración de la dieta aniónica como es el caso de Block (1984), Phillippo y Reid (1994), Goff y Horst (1998). Estos resultados se contradicen totalmente con los encontrados en humana y en roedores, en los que se ha visto que la acidosis metabólica cursa con hipofosfatemia. Los resultados obtenidos en vacuno podrían

explicarse en base a la actuación del hueso como amortiguador en el equilibrio ácido-base, aunque como hemos comentado no es un resultado que se haya obtenido de forma generalizada en los diferentes trabajos.

En relación a los cambios en las concentraciones de magnesio hemos de tener en cuenta que ni el tipo de dieta, ni el tiempo de administración han provocado la aparición de diferencias estadísticamente significativas de este mineral en plasma (tabla 62). Estos resultados coinciden con los de la mayor parte de los autores, tanto en perros a los que se les provocaba un estado de acidosis metabólica aguda o crónica (Gaftner *et al.*, 1980; Roy *et al.*, 1982; Kraut *et al.*, 1986), como en cerdos (Patience y Chaplin, 1997; Budde y Crenshaw, 2003), aves (Jonhson y Karunajeewa, 1985), ovejas (Abu Damir *et al.*, 1991; Espino *et al.*, 2003) y vacas (Fauchon *et al.* 1995; Vagnoni y Oetzel, 1998; Liesegang *et al.*, 2007) a las que se les administraban dietas con variaciones en la DED. Esto nos lleva a deducir que existe bastante estabilidad respecto a las concentraciones de magnesio plasmático con independencia del tipo de dieta suministrada.

En lo que respecta a este catión sería de suponer que su comportamiento frente a estados de acidosis metabólica fuese similar al del calcio, es decir, que como mínimo aumentase la fracción de magnesio ionizado. En nuestro estudio no hemos contado con la posibilidad de medir este ión, pero resultados obtenidos en humana (Blumberg *et al.*, 1998) no han demostrado que los estados de acidosis cursen con aumentos del magnesio total ni del ionizado pero sí con magnesuria, por lo que podemos suponer que existe un equilibrio efectivo entre la entrada de magnesio en el torrente sanguíneo y su eliminación renal. A su vez la mayor entrada de este mineral en sangre podría ser debida a un incremento en la resorción ósea o a un aumento de su absorción intestinal en estados de acidosis, pero para probar esto hacen falta un mayor número de estudios.

Como ya hemos adelantado la administración de la dieta aniónica estuvo relacionada con un aumento en sangre del TCTI, marcador de resorción ósea cuyo incremento nos indica que se está produciendo una resorción activa del hueso por parte de los osteoclastos. Con motivo de este resultado nos preguntamos cómo es posible que no hallamos podido constatar variaciones en las concentraciones de calcio, fósforo y magnesio. La respuesta a esta cuestión la encontraríamos probablemente en la excreción urinaria de dichos minerales, ya que han sido hasta el momento muchos investigadores los que han detectado la presencia de hipercalciuria, hiperfosfaturia e hipermagnesuria en asociación a estados de acidosis metabólica crónica en las diferentes especies animales y en el hombre. Además hay que



señalar que en la mayoría de estos estudios el aumento de la excreción urinaria de estos minerales no estuvo relacionada con variaciones en las concentraciones plasmáticas de los mismos (Lemann *et al.*, 1966; Lemann *et al.*, 1967; Shapiro *et al.*, 1987; Abu Damir *et al.*, 1991; Krapf *et al.*, 1992; Bumberg, 1998; Maurer *et al.*, 2003; Lina y Kuijpers, 2004; Kim y Park, 2005; Gezen *et al.*, 2005; Osther, 2006; Nijenhuis *et al.*, 2006).

De todos modos aunque la mayoría de los estudios que se han realizado aplicando el concepto de DED han constatado la presencia de hipercalciuria asociada a la disminución de la DED (Abu Damir *et al.*, 1991; Patience y Chaplin, 1997; Golz y Crenshaw, 1991, Budde y Crenshaw, 2003; McLeay *et al.*, 2004), los resultados en lo referente a la excreción de fósforo y magnesio han sido mucho más contradictorios.

### **6.3. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE OTROS PARÁMETROS HEMÁTICOS: HEMATOCRITO Y HEMOGLOBINA**

Como hemos visto en el apartado de resultados, el hematocrito y la hemoglobina (tablas 64 y 66) no están influidos por el tiempo de administración de las dietas pero sí por el tipo de alimento administrado, siendo en el grupo de animales alimentados a base de la dieta catiónica donde se alcanzaban valores más elevados en estos dos parámetros (diferencias estadísticas en los días 17, 20 y 24 de muestreo). Hay que tener en cuenta que a pesar de este hecho, los niveles de ambos indicadores hematológicos se mantuvieron durante todo el estudio dentro de los valores normales para la especie canina.

Como norma general, han sido muy pocos los autores que se han ocupado de estudiar los efectos de las variaciones en la DED sobre el valor hematocrito y las concentraciones de hemoglobina. Dersjant-Li *et al.* (2002), trabajando en cerdos, observaron una disminución de la hemoglobina en sangre en los animales alimentados con una DED de -100 mEq/kg que no aparecía en los que se administraba una ración de 200 mEq/kg. Esta disminución sólo se hacía evidente en las primeras horas tras la ingesta de alimento, volviendo a la normalidad en torno a las 5 horas después de la comida. Por otro lado, Patience y Wolynetz (1990), trabajando en esta misma especie, encontraron un descenso lineal del hematocrito cuando la DED era disminuida de 248 a -176 mEq/kg, atribuyéndole a este hecho la presencia de una menor oxigenación tisular que según ellos podría ser la responsable del descenso de la ingesta de alimento que aparecía en los animales alimentados con las dietas de menor DED.

Hay que destacar que ninguno de estos dos autores aporta una explicación fisiológica del motivo al que puede deberse estas variaciones en los parámetros hemáticos.

En nuestro trabajo observamos el efecto contrario, es decir, un aumento del valor hematocrito con el descenso de la DED. En un principio, ante estos resultados y teniendo en cuenta que los estados de acidosis provocan un aumento en el volumen urinario excretado (Schober, 1996) pensamos que el incremento de estos parámetros podría deberse a una ligera hemoconcentración, además la mayor cantidad de agua perdida se acompañaría de natriuresis, por lo que no tendríamos que encontrar aumentos del sodio plasmático ni cambios en el agua libre. Por otro lado Fredeen *et al.* (1988b) describieron un aumento del consumo de agua rumiantes a medida que la DCAD se hacía más positiva lo que podría indicarnos una tendencia a la hemodilución, de todos modos en ninguno de los trabajos comentados hasta este momento realizaron una medición de las proteínas totales ni de la albúmina. El hecho de que nosotros no hayamos encontrado la presencia de variaciones entre grupos del sodio, de las proteínas totales, ni la albúmina nos lleva a alejarnos de la teoría de que las variaciones observadas puedan deberse a cambios en el estado de hidratación.

La única explicación que podemos aportar al aumento estadísticamente significativo del hematocrito y de la hemoglobina es que exista una relación entre tales resultados y la tendencia de dicho grupo a presentar unas concentraciones plasmáticas de cortisol (tabla 78) más elevadas, lo que provocaría que durante la última parte del periodo experimental las concentraciones de hematocrito y hemoglobina fueran superiores en este grupo, basándonos en el efecto estimulador de la eritropoyesis que presenta esta hormona.

#### **6.4. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS: GLUCOSA, PROTEÍNAS TOTALES, ALBÚMINA, UREA Y CREATININA**

Comenzaremos este apartado comentando las variaciones que aparecieron en la glucosa sanguínea durante el desarrollo de nuestro periodo experimental. Es importante mencionar que la dieta presentó una influencia marcada sobre las concentraciones de glucosa, puesto que durante gran parte del experimento, en el grupo de animales alimentados con la dieta aniónica presentó concentraciones significativamente mayores que los otros dos grupos, llegando a aparecer diferencias significativas los días 10, 13, 17, 20 y 27 de muestreo (tabla

68). Además, en el día 24 los perros alimentados con la dieta catiónica presentaron una disminución estadísticamente significativa respecto a las otras dos dietas.

Debemos destacar que no han sido muchos los estudios que han valorado la influencia de variaciones en la DED sobre las concentraciones sanguíneas de glucosa, de hecho en todos los trabajos de aves, ovejas y cerdos en los que se ha estudiado este parámetro no han detectado una influencia directa de la variación de la DED sobre sus concentraciones (Boukila *et al.*, 1995; Patience y Chaplin, 1997; Borges *et al.*, 2003; Gezen *et al.*, 2005).

Por otro lado Siruco *et al.* (1998) constataron un aumento de la actividad glucocorticoide asociada a estados de acidosis metabólica en medicina humana, y Espino *et al.* (2005) hallaron la presencia de un hipercortisolismo moderado en relación a la administración de dietas enriquecidas con sales aniónicas en ovejas. Basándonos en los resultados encontrados por estos autores y teniendo en cuenta nuestros propios resultados para la concentración de cortisol sérico (tabla 78), nosotros pensamos que el incremento en la concentración de glucosa observado en nuestro estudio puede estar relacionado con un aumento de la secreción de las hormonas relacionadas con el estrés, es decir, adrenalina, noradrenalina y glucocorticoides motivado por el consumo de la dieta acidificante, ya que tal como hemos mencionado con anterioridad, los animales se encontraban perfectamente habituados a la manipulación durante la recogida de las muestras y, además, el efecto de estrés resultante del manejo sería idéntico con las tres dietas.

En lo que respecta a las concentraciones de proteínas totales y albúmina en plasma (tabla 70 y 72), como hemos visto en el apartado de resultados, no hemos observado la presencia de influencia significativa del tipo de tratamiento dietético sobre estos dos parámetros.

Aunque en nuestro estudio no hemos medido la cantidad de agua ingerida por los animales, ni el volumen urinario excretado, hemos valorado de forma indirecta las variaciones del LEC a través de la medición de las proteínas totales, la albúmina, del hematocrito y de la hemoglobina (estos dos últimos parámetros ya los hemos comentado en el apartado anterior). El hecho de que no hayamos detectado la aparición de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos refleja que no existen variaciones importantes en su estado de hidratación. Los resultados obtenidos en nuestro estudio concuerdan con los hallados con anterioridad por la mayor parte de los trabajos en los que se ha estudiado la influencia de variaciones en la DED sobre las concentraciones de proteínas plasmáticas y de albúmina (Boukila *et al.*, 1995; Patience y Chaplin, 1997).

Las variaciones que pueden presentarse en las proteínas totales y en la albúmina poseen gran importancia en el equilibrio ácido-básico, puesto que se encuentran integradas en la variable independiente  $A_{TOT}$ , es decir, que funcionan como ácidos débiles en el plasma. Debido a esto, es importante tener en cuenta que disminución en la concentración de estos parámetros en sangre conduce a la aparición de alcalosis, mientras que incrementos de los mismos provocan la aparición de acidosis (Russell *et al.*, 1996).

Seguidamente abordaremos los resultados que hemos obtenido para las concentraciones plasmáticas de urea y creatinina de forma conjunta.

Debemos destacar que no hemos constatado influencia del tipo de dieta ni del tiempo de administración de las mismas sobre ninguno de estos dos parámetros (tabla 74 y 76). Además sus valores se mantuvieron en todo momento dentro del intervalo de referencia normal para la especie canina. Estos resultados coinciden para la creatinina con los de Magner *et al.* (1988) trabajando con perros, y para la urea con los de DeRouchey *et al.* (2003) trabajando con cerdos, dato al que nos referimos al carecer de una referencia específica para perros.

Por otro lado, en lo que respecta a las concentraciones de urea, existen trabajos en cerdos que han descrito una disminución de la ureagénesis hepática en relación con la administración de dietas acidificantes (Kashiwagura *et al.*, 1984; Patience y Chaplin, 1997), lo que realmente parece estar más relacionado con el contenido en cloro de la ración que con la DED (Coffey *et al.*, 1985; Dersjant-Li *et al.*, 2001a). En nuestro trabajo aunque el contenido en cloro de la dieta aniónica es mayor que el presente en las otras dos raciones no hemos detectado este efecto, tal vez porque la tendencia hacia la acidosis metabólica es muy moderada, aunque sí que es necesario mencionar que la media de los valores de urea obtenidos cuando los animales eran alimentados con la dieta catiónica eran inferiores a cuando se administraron las otras dietas, pero sin llegar a aparecer en ningún momento ni significación estadística ni tendencia a la significación estadística.

## 6.5. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE EL CORTISOL SÉRICO

En el apartado de resultados hemos visto que las concentraciones de cortisol (tabla 78) eran siempre más elevadas en el grupo de animales alimentado con la dieta aniónica y, aunque no pudimos detectar elevaciones estadísticamente significativas, hay que tener en cuenta que

en el día 17 llega a hacerse evidente una tendencia hacia la significación entre las dietas control y aniónica.

Como en el resto de los parámetros estudiados en nuestro trabajo, en ningún momento llega a existir una evidencia de que la dieta control y la catiónica provoquen efectos diferentes sobre el cortisol sérico.

En medicina humana la administración de dietas acidificantes ha sido asociada por varios autores, entre los que se encuentran Siruco *et al.*, 1998 y Maurer *et al.*, 2003, con aumentos significativos del cortisol sanguíneo y de la excreción urinaria de tetrahydrocortisona y cortisol. Teniendo en cuenta estos resultados, dichos autores consideran que los efectos que las dietas acidificantes provocan en el hueso, pueden estar mediados, al menos en parte, por el incremento de la cortisolemia con el que cursa el consumo de este tipo de dietas. Maurer *et al.* (2003) comprobaron, además, que al neutralizar el aporte ácido de la dieta los niveles de cortisol volvían a disminuir.

Los diversos artículos publicados sobre los efectos de la DCAD y de la DED en el sistema endocrino se han centrado, en su mayor parte, en las hormonas calciotropas. En la bibliografía revisada sólo hemos encontrado el trabajo de Espino *et al.* (2005) en el que se valora el efecto que tiene la administración de una dieta enriquecida en sales aniónicas sobre la glándula adrenal. Estos autores comprobaron que la administración de dietas aniónicas en ovejas durante el periodo en torno al parto inducía la aparición de una ligera acidosis metabólica y de un hipercortisolismo moderado asociado a la ingesta de este tipo de ración. Estos últimos investigadores opinan harían falta años para que un hipercortisolismo ligero como el que ellos detectaron provocase un incremento en las pérdidas de hueso.

En nuestro estudio no creemos que el ligero incremento del cortisol endógeno encontrado, asociado a la administración de la dieta aniónica, de lugar por sí solo a una pérdida de hueso, y, además, si esto llegase a ocurrir en algún momento sería tras años de consumo de la dieta acidificante de forma crónica, incluso más años de los que puede llegar a vivir un perro. Nosotros basamos esta afirmación en estudios previos realizados tanto en personas como en animales, en los que se ha visto que el efecto de dosis farmacológicas de corticoides disminuye la formación del hueso, comenzando estos efectos a partir de los 6-12 meses de su administración de forma crónica (Izawa *et al.*, 1985; Ton *et al.*, 2005). En lo que respecta a la resorción ósea, en humanos, sólo se ha detectado mediante la administración de dosis muy superiores a las farmacológicas (Canniggia *et al.*, 1981; Dempster, 1989; Lo Cascio *et*

*al.*, 1998), mientras que la administración de dosis bajas de corticoides no trajo consigo un aumento de los marcadores bioquímicos de resorción ósea (Ton *et al.*, 2005). Por lo que trabajando solamente con el efecto que produce la dieta acidificante sobre los corticoides endógenos es de suponer que el tiempo que los animales deberían consumir dicha dieta para que los efectos óseos fueran evidentes sería muy largo.

De todos modos creemos que sería interesante la realización de más estudios que nos ayudasen a comprender, en el caso del perro, el efecto que presenta el aumento de corticoides asociados a la administración de dietas con DED negativa sobre el metabolismo del calcio, puesto que a día de hoy, por ejemplo, no se sabe de forma clara cuales son los efectos de estas hormonas sobre las concentraciones de vitamina D y sobre la expresión de sus receptores.

## **6.6. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE LOS MARCADORES DE REMODELACIÓN ÓSEA**

En este estudio, al igual que ya hicieron con anterioridad otros autores como Block (1984), Van Mosel *et al.* (1993), Abu Damir *et al.* (1994), Joyce *et al.* (1997), Goff y Horst (1997 y 1998), Liesegang *et al.* (2007) en vacuno y Abu Damir *et al.* (1991), Espino *et al.* (2003) en ovejas, hemos decidido emplear la determinación de marcadores de remodelación ósea para estudiar la acción de dietas con DED diferentes sobre el metabolismo óseo.

En el momento en el que nos planteamos el diseño experimental de este trabajo tuvimos que decantarnos por cuales de la amplia gama de marcadores óseos mediríamos. La primera decisión fue relativamente fácil emplearíamos únicamente marcadores que se determinaran en suero, el motivo de ello es porque según Ladlow *et al.* (2002) la variación a largo plazo intra-individuos es menor cuando las determinaciones de los marcadores se llevan a cabo en suero que en orina. Además en todo momento fuimos rigurosos con el horario de muestreo con el fin de que las diferencias observadas entre los grupos fueran debidas primordialmente a la acción de las diferentes dietas.

Como ya hemos mencionado en el apartado de material y métodos, como indicador de la resorción ósea hemos seleccionado el telopéptido carboxiterminal de colágeno tipo I, esto ha sido debido, por un lado a que se trata de un excelente marcador de resorción ósea puesto que deriva directamente de la destrucción del colágeno y, además, su utilidad en perros

como marcador de patologías óseas ha sido demostrada en trabajos previos importantes (Philipov *et al.*, 1995).

En el caso de los marcadores de formación ósea hemos elegido la fosfatasa alcalina de origen óseo puesto que presenta un importante papel tanto en la formación como en la calcificación del osteoide (Allen *et al.*, 2000a; Nishizawa *et al.*, 2005). Además la mayoría de los trabajos llevados a cabo en perros consideran este marcador como referente de la formación ósea, con lo cual su uso se encuentra mucho más avalado en esta especie (Watts, 1999; Ehrhart *et al.*, 1998; Komnenou *et al.*, 2005).

### 6.6.1. TELOPÉPTIDO CARBOXITERMINAL DE COLÁGENO TIPO I: TCTI

Como podemos observar en el apartado de resultados, en la tabla 80, la variable independiente “dieta” presentó una influencia estadísticamente significativa sobre las concentraciones plasmáticas de telopéptido carboxiterminal de colágeno tipo I. Es necesario destacar que durante todo el periodo experimental los niveles de TCTI se mantuvieron en valores más elevados en los animales alimentados con la dieta aniónica, presentado significación estadística en los días 10 y 17 entre la dieta aniónica y la catiónica, también existió una tendencia hacia la significación estadística ( $p < 0,1$ ) entre esas mismas dietas los días 3 y 20. No se manifestaron en ningún momento diferencias entre los animales alimentados con la dieta catiónica y la control. Además hay que señalar que los valores para los tres grupos se mantuvieron siempre dentro del intervalo descrito para perros adultos de entre 3 y 7 años aportado por Allen *et al.* (1998).

Como ya hemos mencionado en el apartado de material y métodos la toma de muestras se realizó siempre a la misma hora, para disminuir al máximo la presencia oscilaciones circadianas, y tras un ayuno de 23 horas con el fin de minimizar un posible efecto de la dieta sobre los marcadores, ya que aunque parece ser que no existe en el caso del TCTI se ha demostrado en otros marcadores como, por ejemplo, en la hidroxiprolina (Liesegang *et al.*, 1999). A mayores de todo esto, hemos tenido también la precaución de realizar todo el diseño experimental en los meses de otoño-invierno aunque, en el caso del perro, no se hayan descrito variaciones a lo largo de un periodo de 12 semanas (Ladlow *et al.*, 2002). Esta decisión se tomó para intentar evitar posibles fluctuaciones estacionales puesto que a día de hoy aún no se han realizado estudios en esta especie con una duración superior al de Ladlow *et al.* (2002). Debido a todas las precauciones tomadas creemos que las diferencias

observadas en nuestro trabajo no pueden ser debidas a otros factores diferentes al tipo de dieta administrada.

Podemos considerar los resultados obtenidos al analizar las concentraciones de TCTI importantes en el estudio del comportamiento óseo frente a las variaciones de la dieta. El hecho de que en el grupo alimentado con la dieta aniónica las concentraciones de este marcador de resorción ósea sean más altas durante todo el periodo experimental y ya aparezca significación estadística el día 10 de muestreo, demuestra una compensación ósea activa, ante la administración de una dieta acidificante, muy rápida. Estos datos concuerdan en gran medida con los resultados obtenidos en un estudio previo realizado por nuestro equipo de investigación (pendiente de publicación), en el que administrando tres dietas fisiológicas de diferentes casas comerciales, la dieta que proporcionaba una menor DED provocaba aumentos estadísticamente significativos del TCTI (Rodríguez *et al.*, 2007b).

En investigación veterinaria no han sido muchos los trabajos que han valorado las variaciones de los marcadores óseos aplicando dietas de diferente DED. En la especie en la que más se ha empleado la medición de los marcadores ha sido, con diferencia, en vacas lecheras en torno al parto y han utilizado preferentemente marcadores de destrucción ósea diferentes al empleado por nosotros.

En los trabajos de Block (1984), Goff y Horst (1997), Joyce *et al.* (1997) en vacas midieron como marcador de resorción ósea la hidroxiprolina obteniendo resultados muy dispares dependiendo del estudio. Por este motivo, cuando se mide la hidroxiprolina los resultados deben ser interpretados con mucha cautela. Si nos basamos en el estudio de Liesegang *et al.* (1999) sobre marcadores óseos, vemos que es difícil afirmar que la resorción ósea mediada por células esté aumentada escogiendo como único marcador los niveles de hidroxiprolina, teniendo en cuenta los múltiples factores que pueden influir en la concentración sérica o urinaria de esta molécula.

Liesegang *et al.* (2007) determinaron el TCTI en vacas en el periodo peripartal a las que administraban dietas con diferente DCAD y no pudieron detectar variaciones entre los diferentes grupos, concluyendo que probablemente no llegasen a trabajar con DCAD suficientemente bajas.

Abu Damir *et al.* (1991) trabajando con corderos vieron, al octavo día de administración de las dietas, que se estaba produciendo una mayor resorción ósea mediada por células en los animales alimentados con la dieta aniónica. Estos investigadores cuantificaron la FART en



muestras de costilla. Los resultados de nuestro estudio están de acuerdo con los obtenidos por este equipo investigador, puesto que demostraron que en ovejas la resorción ósea mediada por células comienza muy pronto tras el inicio de la administración de la dieta con baja DED.

En medicina humana se lleva estudiando la influencia de la composición dietética sobre el metabolismo óseo desde hace muchos años y la mayoría de los investigadores coinciden en que el consumo de dietas acidificantes provoca un incremento de la excreción neta de ácido, de la excreción urinaria de calcio y un aumento de los marcadores indicativos de resorción ósea, tanto en plasma como en orina (Lemann *et al.*, 1989; Sebastian y Morris, 1994; Buclin *et al.*, 2001; Sellmeyer *et al.*, 2002; Maurer *et al.*, 2003; Jajoo *et al.*, 2006). Además en algunos de estos estudios, el incremento de los marcadores de resorción ósea se produce al poco tiempo de comenzar la administración de dichas dietas (Sebastian y Morris, 1994; Buclin *et al.*, 2001; Maurer *et al.*, 2003) tal y como nosotros hemos observado.

Teniendo en cuenta los resultados que hemos obtenido midiendo el TCTI, pensamos que su determinación en perros detecta fielmente las alteraciones que se están produciendo a nivel óseo, lo que consideramos debe tenerse en cuenta a la hora de plantear futuros trabajos.

En cuanto a los factores que puedan estar provocando un incremento de la resorción ósea mediada por células, y puesto que no hemos realizado determinación de las hormonas calciotropas, sólo podemos decir que consideramos que el ligero incremento del cortisol sérico, que tiene lugar en relación con la administración de la dieta aniónica, no debería estar relacionado con este fenómeno por varios motivos:

- El primero sería porque incrementos del cortisol sérico estarían más relacionados con la disminución de la formación ósea que con el aumento de la resorción (Lyles *et al.*, 1993; Popp *et al.*, 2006).
- El segundo sería porque el tiempo de administración de la dieta fue muy corto para que pudiesen hacerse evidentes pérdidas en la masa ósea relacionados con los cambios observados en los niveles de corticoides circulantes (Espino *et al.*, 2005).

En un estudio realizado en humana por Jajoo *et al.* (2006) encontraron que los cambios inducidos por la dieta sobre la excreción neta de ácido estaban relacionados positivamente con cambios en la PTH. Además existen evidencias de que la acidosis metabólica aguda estimula la secreción de PTH en perros cuando se contrarrestan los cambios en las concentraciones de calcio y de magnesio (López *et al.*, 2002). Asimismo López *et al.* (2003)

comprobaron como la alcalosis metabólica aguda disminuía la secreción de PTH. Por otro lado, Bushinsky y Frick (2000) demostraron que la PTH libera calcio desde el hueso a cualquier pH. Teniendo en cuenta las investigaciones anteriores y que en muchos de los estudios en los que se administran raciones aniónicas se produce un aumento de la excreción neta de ácido, puede ser que los cambios en la PTH medien en parte la resorción ósea que acompaña a la administración de las dietas acidogénicas. De todos modos, esta afirmación se encuentra bajo una gran controversia, puesto que existe una gran disparidad de resultados en las concentraciones de PTH obtenidas en los diferentes estudios que han medido la influencia de la administración de dietas acidificantes y alcalinizantes sobre este parámetro. De este modo, en asociación con la acidosis metabólica crónica existen autores que no han constatado ningún cambio en la PTH, como Buclin *et al.* (2001) trabajando en medicina humana y Abu Damir *et al.* (1994) trabajando con vacas; otros que han detectado un aumento de sus concentraciones como Jajoo *et al.*, 2006 en humana y Abu Damir *et al.* (1991) en corderos, y autores que han constatado una disminución de las mismas, como Krapf *et al.*, 1992 y Wiederkehr y Krapf, 2001 trabajando en humana, Goff *et al.* (1991), Joyce *et al.* (1997) trabajando en vacuno, Bushinsky *et al.* (1989) en ratas y Espino *et al.* (2003) estudiando los efectos de las dietas aniónicas en ovejas.

Con respecto al calcitriol, las afirmaciones de los diferentes autores también son muy dispares, con lo que no podemos intuir si el aumento de la resorción ósea mediada por células podría estar relacionado directa o indirectamente con la variación de los niveles séricos de dicha hormona. Al igual que en el caso de la PTH, existen autores que han constatado un aumento de los niveles de calcitriol séricos en relación a la acidosis metabólica como Kapf *et al.*, 1992 y Wiederkehr y Krapf, 2001 en humana, Abu Damir *et al.* (1994) en vacas, Abu Damir *et al.* (1991) en ovejas y Gafter *et al.* (1980) en ratas. Mientras que por el contrario existen trabajos como los de Joyce *et al.* (1997) en vacuno y Bushinsky *et al.* (1989) en ratas, en los que se observó una menor concentración de calcitriol en relación con la administración de la dieta aniónica.

Con lo cual, debido a toda la disparidad de resultados encontrados a lo largo de nuestra revisión y teniendo en cuenta que nosotros no hemos medido las concentraciones de las hormonas calciotropas, nos es imposible avanzar en el esclarecimiento de cual es el mecanismo último por el que en los animales que consumen la dieta aniónica se produce un incremento de la resorción ósea mediada por células.

### 6.6.2. FOSFATASA ALCALINA DE ORIGEN ÓSEO (FAO)

En nuestro trabajo no observamos influencia ni del tipo de dieta, ni del tiempo de administración de las mismas sobre la fosfatasa alcalina de origen óseo (tabla 82). Además los valores obtenidos para los tres grupos se encuentran dentro del intervalo de referencia descrito por Syakalima *et al.* (1997) y por Allen *et al.* (1998) para perros adultos.

Como hemos visto durante la revisión bibliográfica tanto estudios realizados *in vitro* como *in vivo* han demostrado que estados de acidosis conducen a la disminución de la FA y de la FAO, es decir, de la formación ósea mediada por células (Krieger *et al.*, 1992; Abu Damir *et al.*, 1991; Brandao-Burch *et al.*, 2005), mientras que estados de alcalosis presentan el efecto contrario (Bushinsky, 1996). En cambio pocos han sido los trabajos que han detectado cambios en los marcadores de formación ósea asociados a modificaciones en la DED (Simons *et al.*, 1987).

El marcador de formación ósea que más se ha venido empleando en rumiantes ha sido la osteocalcina y los resultados encontrados por los diferentes autores en torno al periodo peripartal son muy contradictorios. Mientras existen autores que no han reportado variación ninguna de este marcador entre dietas de diferente DCAD (Liesegang *et al.*, 2007). Otros investigadores han constatado una situación diferente en el metabolismo del calcio en rumiantes en torno al parto, de este modo Espino *et al.* (2003) encontraron que en ovejas alimentadas con dieta aniónica presentaban un nivel de OC significativamente mayor durante el periodo que rodeaba al parto respecto a aquellos animales alimentados con la dieta catiónica. Estos resultados se manifiestan en contra de la teoría de que la acidosis metabólica reduce la neoformación ósea, pero deben de interpretarse teniendo en cuenta la situación fisiológica peripartal de los animales. Abu Damir *et al.* (1991) trabajando en corderos detectaron que los animales alimentados con dieta catiónica presentaban concentraciones locales de fosfatasa alcalina en muestras de costilla más elevadas que los alimentados con dieta aniónica, resultados que difieren notablemente de lo encontrado en ovejas gestantes. Con este último estudio vemos claramente que el comportamiento de los marcadores óseos con diferentes dietas es completamente diferente dependiendo del estado fisiológico en el que se encuentren los animales, con lo cual en nuestro estudio no nos podemos guiar en gran medida por comparaciones con resultados obtenidos en animales gestantes.

Teniendo en cuenta que la fosfatasa alcalina de origen óseo es un marcador adecuado en el perro para valorar la formación ósea, el hecho de que no hayamos obtenido diferencias estadísticamente significativas en la actividad de este marcador puede estar relacionado con que nosotros no hemos inducido un estado de alcalosis metabólica con el aumento de la DED, con lo cual no tendría porqué resultar evidente un aumento de la formación ósea mediada por células (Bushinky, 1996).

Podemos añadir, a modo de resumen, que las tres hipótesis que tratan de explicar el efecto de la acidosis sobre el hueso son las siguientes:

- Desmineralización ósea pasiva (Domínguez y Raisz, 1979; Kunkel *et al.*, 1986; Joyce *et al.*, 1997; MacLeay *et al.*, 2004). Realmente con nuestros resultados no podemos llegar a comprobar si se está produciendo o no.
- Aumento de la resorción ósea mediada por células acoplada a un mecanismo de aumento de la formación ósea (Van Mosel *et al.*, 1994; Espino *et al.*, 2003).
- Aumento de la resorción ósea mediada por células produciéndose un desacoplamiento con la formación ósea (Kraut *et al.*, 1986; Abu Damir *et al.*, 1991; Brandao-Burch *et al.*, 2005).

Nuestros resultados, trabajando en perros, coinciden con los de estos últimos investigadores, ya que hemos constatado aumentos significativos de las concentraciones de TCTI pero la FAO no sufre ningún tipo de modificación. Este hecho resulta difícil de explicar puesto que los diferentes investigadores aún no han logrado comprender bien el mecanismo último de porqué se produce este desacoplamiento. En algunos casos se ha propuesto que podría estar mediado por incrementos de la PTH aunque este fenómeno todavía resulta difícil de entender si tenemos en cuenta que los osteoclastos no presentan receptores para esta hormona y han de ser activados por moléculas sintetizadas previamente por los osteoblastos. Algunos investigadores trabajando *in vitro* en el campo de la fisiología consideran que este aumento de la resorción ósea mediada por células puede estar relacionado con un incremento endógeno de las concentraciones de prostaglandinas y del factor RANKL (factor osteoclastogénico sintetizado en los osteoblastos) que presenta una respuesta prostaglandina dependiente.

Por otro lado, con el aumento de la DED de la ración no hemos encontrado variaciones de los marcadores de remodelación ósea respecto a la dieta control, resultados esperables puesto

que no hemos hallado diferencias prácticamente en ninguno de los parámetros estudiados entre los grupos alimentados con dichas dietas.

Como punto final señalar que a los niveles de DED con los que nosotros hemos trabajado no se hacen evidentes cambios en la FAO, resultados que coinciden con los de Liesegang *et al.* (2007), lo que no quiere decir que trabajando con un abanico más amplio de diferencias electrolíticas de la dieta pudiesen llegar a constatarse cambios en la actividad de este marcador.



*Conclusiones*





## 7. CONCLUSIONES

1. La disminución de la DED de la dieta hasta el valor de 0 mEq/kg de MS, mediante el aporte de sales aniónicas en perros beagle, conduce a la aparición de una tendencia a la acidosis metabólica hiperclorémica con presencia de compensación respiratoria parcial.
2. El aumento de la DED de la dieta hasta el valor de 264 mEq/kg de MS, mediante el empleo de sales catiónicas, no produce la aparición de diferencias importantes en los parámetros empleados para la evaluación del equilibrio ácido-básico en comparación con la dieta control (DED=132 mEq/kg de MS).
3. La administración de la dieta aniónica ocasiona un descenso rápido de los valores del pH urinario, pero los cambios que aparecen en este parámetro no reflejan fielmente las variaciones del pH sanguíneo.
4. La tendencia a la acidosis metabólica, que muestran los perros alimentados con la dieta aniónica, se acompaña de un incremento en la concentración sanguínea de calcio iónico, mientras que el calcio total, el fósforo y el magnesio no experimentan cambios significativos.
5. Los cambios en las concentraciones sanguíneas de minerales más importantes en el grupo alimentado con la dieta aniónica fueron un aumento de la cloremia y una disminución de la calemia.
6. Los cambios bioquímicos más relevantes que aparecieron como consecuencia de la administración de la dieta aniónica fue un aumento de las concentraciones plasmáticas de glucosa.
7. El empleo de dietas con baja DED en perros beagle está relacionado con una mayor resorción ósea mediada por células (incremento de TCTI). Esto debería tenerse en cuenta a la hora de formular los piensos caninos.
8. Aunque la administración de la dieta aniónica estuvo relacionada con una tendencia al aumento de las concentraciones de cortisol en sangre, no consideramos que los niveles de esta hormona puedan estar relacionados con el incremento de la resorción ósea mediada por células.

## **CONCLUSIÓN FINAL**

Variaciones en la DED cursan con cambios en el equilibrio ácido-base y en el metabolismo mineral y óseo en los perros. Debido a la variedad de diferencias electrolíticas existentes en las dietas comerciales para perros y las repercusiones orgánicas que la DED ocasiona, se hacen aconsejables estudios adicionales. En futuras investigaciones deberían considerarse periodos de tiempo más prolongados, así como los parámetros medidos en este trabajo y otros como la determinación de las hormonas calciotropas, de la GH y del IGF-1.

## *Bibliografia*



## 8. BIBLIOGRAFÍA

**AAFCO.** 1998. American Feed Control Officials. Official Publication.

**ABU DAMIR, H; SCOTT, D; THOMPSON, JK; TOPPS, JH; BUCHAN, W Y PENNIE, K.** 1990. The effect of a change in blood acid-base status on body composition and mineral retention in growing lambs. *Anim. Prod.* 51: 527-534.

**ABU DAMIR, H; SCOTT, D; LOVERIDGE, N; BUCHAN, W Y MILNE, J.** 1991. The effects of feeding diets containing either  $\text{NaHCO}_3$  or  $\text{NH}_4\text{Cl}$  on indices of bone formation and resorption and on mineral balance in the lamb. *Exp. Physiol.* 76: 725-732.

**ABU DAMIR, H; PHILLIPPO, M; THORP, BH; MILNE, JS; DICK, L Y NEVISON, IM.** 1994. Effects of dietary acidity on calcium balance and mobilisation, bone morphology and 1,25 dihydroxivitamin D in prepartal dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 56: 310-318.

**ADROGUE, HJ; BRENSILVER, J Y MODIAC, NE.** 1978. Changes in the plasma anion gap during chronic metabolic acid-base disturbances. *Am. J. Physiol.* 235: F291-F297.

**AGUILERA-TEJERO, E; HERNÁNDEZ, H; ESTEPA, JC; MAYER-VALOR, R Y RODRÍGUEZ, M.** 1997. Arterial blood gases and acid-base balance in geriatric dogs. *Res. Vet. Sci.* 63: 253-256.

**ALFREY AC Y MILLER, N.** 1973. Bone magnesium pools in uremia. *J. Clin. Invest.* 52: 3019-3027.

**ALLEN, SH; NUTLEMAN, PR; KETCHAM, CM Y ROBERTS, RM.** 1989. Purification and characterization of human bone tartrate-resistant acid phosphatase. *J. Bone Miner. Res.* 4: 47-55.

**ALLEN, MJ; HOFFMANN, WE; RICHARDSON, DC Y BREUR, GJ.** 1998. Serum markers of bone metabolism in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 59: 250-254.

**ALLEN, LC; ALLEN, MJ; BREUR, GJ; HOFFMANN, WE Y RICHARDSON, DC.** 2000a. A comparison of two techniques for the determination of serum bone-specific alkaline phosphatase activity in dogs. *Res. Vet. Sci.* 68: 231-235.

- ALLEN, MJ; ALLEN, LCV; HOFFMANN, WE; RICHARDSON, DC Y BREUR, GJ.** 2000b. Urinary markers of type I collagen degradation in the dog. *Res. Vet. Sci.* 69: 123-127.
- ARANDA, P; PLANELLS, E Y LLOPIS, J.** 2000. Magnesio. Scientific Communication: Art o Technique. *Ars Pharmaceutical.* 41 (1): 91-100.
- ARICETA, G; VALLO, A Y RODRIGUEZ, J.** 2004. Acidosis increases magnesiuria in children with distal renal tubular acidosis. *Pediatr. Nephrol.* 19: 1367-1370.
- ARNETT, T.** 2004. Estructura y remodelado del hueso. En: Riancho, JA y González J. "Manual de osteoporosis". Primera edición. Madrid: Jarpyo Editores SA. 1-6.
- ARNETT, TR Y DEMPSTER, DW.** 1986. Effect of pH on one resorption by rat osteoclasts *in vitro*. *Endocrinology* 119: 110-124.
- AUSTIC, RE Y CALVERT, CC.** 1981. Nutritional interrelationships of electrolytes and amino acids. *Fed. Proc.* 40: 63.
- BAILEY, JE Y PABLO, LS.** 1998. Practical approach to acid-base disorders. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 28: 645-661.
- BAKER, DH Y CZARNECKI-MAULDEN, GL.** 1991. Comparative nutrition of cats and dogs. *Annu. Rev. Nutr.* 11: 239-263.
- BANKS, WJ.** 1986. Supportive tissues-Bone. En: Banks, WJ. "Applied Veterinary Histology". Segunda edición. Baltimore: Williams & Wilkins. 119-144.
- BARBER, P.** 2001. Disorders of calcium homeostasis in small animals. *In Pract.* 23: 262-269.
- BARZEL, US.** 1969. The effect of excessive acid feeding on bone. *Calcif. Tissue Res.* 4: 94-100.
- BARZEL, US.** 1975. Studies on osteoporosis: the long-term effect of oophorectomy and of ammonium chloride ingestion on the bone of mature rats. *Endocrinology* 96: 1304-1306.
- BASSETT, JH Y WILLIAMS, GR.** 2003. The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Trends Endocrinol. Metab.* 14 (8): 356-364.
- BATLLE, D; ITSARAYOUNGYUEN, K; HAYS, S; ARRUDA, JAL Y KURTZMAN, NA.** 1982. Parathyroid hormone is not anticalciuric during chronic metabolic acidosis. *Kidney Int.* 22: 264-271.

- BECK, N.** 1981. Effect of metabolic acidosis on renal response to parathyroid hormone in phosphorus deprived rats. *Am. J. Physiol.* 241: F23-F27.
- BECK, N; KIM, HP Y KIM, KS.** 1975. Effect of metabolic acidosis on renal action of parathyroid hormone. *Am. J. Physiol.* 228: 1483-1488.
- BECK, N Y WEBSTER, SK.** 1976. Effects of acute metabolic acidosis on parathyroid hormone action and calcium mobilization. *Am. J. Physiol.* 230: 127-131.
- BELLORIN-FONT, E; HUMPIERRES, J; WEISINGER, JR; MILANES, CL; SYLVA, V Y PAZ-MARTÍNEZ, V.** 1985. Effect of metabolic acidosis on the PTH receptor-adenylate cyclase system of canine kidney. *Am. J. Physiol.* 249: F566-72.
- BERNE, RM Y LEVY, MD.** 1992. Regulación del potasio, del sodio, del calcio, del magnesio, del fosfato y equilibrio ácido-base. En: Berne, RM y Levy, MD. "Fisiología". Primera edición. Barcelona: Mosby-Year Book. 460-476.
- BICHARA, M; MERCIER, O; BORENSZTEIN, P Y PAILLARD, M.** 1990. Acute metabolic acidosis enhances circulating parathyroid hormone, which contributes to the renal response against acidosis in the rat. *J. Clin. Invest.* 86: 430-443.
- BLAIR, HC.** 1998. How the osteoclast degrades bone. *BioEssays* 20: 837-846.
- BLOCK, E.** 1984. Manipulating dietary anions and cations for prepartum dairy cows to reduce incidence of milk fever. *J. Dairy. Sci.* 67: 2939-2948.
- BLOOM, W Y FAWCETT, DW.** 1995. Hueso. En: Bloom, W y Fawcett, DW. "Tratado de histología". Duodécima edición. Madrid: Interamericana McGraw-Hill. 217-260.
- BLUMBERG, D; BONETTI, A; JACOMELLA, V; CAPILLO, S; TRUTTMANN, AC; LÜTHY, CM; COLOMBO, JP Y BIANCHETTI, MG.** 1998. Free circulating magnesium during acute metabolic acidosis in humans. *Am. J. Nephrol.* 18: 233-236.
- BORGES, SA; MAIORKA, A; DE LAURENTIZ, AC; FISCHER DA SILVA, AV; SANTIN, E Y ARIKI, J.** 2002. Balanço eletrolítico para frangos de corte na primeira semana de idade. *Revista Brasileira de Ciencia Avícola* 4 (2): 149-153.
- BORGES, SA; FISCHER, DA; SILVA, AV; ARIKI, J; HOOGE, DM Y CUMMINGS, KR.** 2003. Dietary electrolyte balance for broiler chickens exposed to thermoneutral or heat-stress environments. *Poult. Sci.* 82: 428-435.

- BORNEFALK, E; DAHLEN, I; MICHAELSSON, K; LJUNGGREN, O Y LJUNGHALL, S.** 1998. Age-dependent effect of oral glucocorticoids on markers of bone resorption in patients with acute asthma. *Calcif. Tissue Int.* 63: 9-13.
- BOUKILA, B; SEOANE, JR; GOULET, J; BERNIER, JF Y PETIT, HV.** 1995. Effect of feeding fermented, ammoniated, condensed whey permeate on intake, digestibility, rumen fermentation, and acid-base balance in sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 75: 135-143.
- BRANDAO-BURCH, A; UTTING, JC; ORRISS, IR Y ARNETT, TR.** 2005. Acidosis inhibits bone formation by Osteoblasts *in vitro* by preventing mineralization. *Calcif. Tissue Int.* 77: 167-174.
- BRAY, DL Y BRIGGS, GM.** 1984. Decrease in bone density in young male guinea pigs fed high levels of ascorbic acid. *J. Nutr.* 114: 920-928.
- BREUR, GJ; ALLEN, MJ; CARLSON, SJ Y RICHARDSON, DC.** 2004. Markers of bone metabolism in dog breeds of different size. *Res. Vet. Sci.* 76: 53-55.
- BREVER, LD; TIBAUT, V; CHEN, KC; LANGUB, MC; LANDFIELD, PW Y PORTER, NM.** 2001. Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with down-regulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. *J. NeuroSci.* 21: 98-108.
- BROSANAN, JT Y BROSANAN, ME.** 1982. Dietary protein, metabolic acidosis, and calcium balance. En: Draper, HH. "Advances in nutritional research". First edition. New York: Plenum Press. 77-105.
- BUWAY, N; SAROSI, I; DUNSTAN, CR; MORONY, S; TARPLEY, J; CAPPARELLI, C; SCULLY, S; TAN, HL; XU, W; LACEY, DL; BOYLE, WJ Y SIMONET, WC.** 1998. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 12: 1260-1268.
- BUCLIN, T; COSMA, M; APPENZELLER, M; JACQUET, AF; DECOSTERD, LA; BIOLLAZ, J Y BURCKHARDT, P.** 2001. Diet acids and alkalis influence calcium retention in bone. *Osteoporos. Int.* 12: 493-499.
- BUDDE, RA Y CRENSHAW, TD.** 2003. Chronic metabolic acid load induced by changes in dietary electrolyte balance increased chloride retention but did not compromise bone in growing swine. *J. Anim. Sci.* 81: 197-208.



- BUNCE, GE; CHIEMCHASRI, Y Y PHILLIPS, PH.** 1962a. The mineral requirements of the dog. IV. Effect of certain dietary and physiologic factors upon the magnesium deficiency syndrome. *J. Nutr.* 76: 23-29.
- BUNCE, GE; JENKINS, KJ Y PHILLIPS, PH.** 1962b. The mineral requirements of the dog. III. The magnesium requirement. *J. Nutr.* 76: 17-22.
- BURGER, IH.** 1989. Necesidades Nutritivas del perro y el gato. En: Edney, ATB. "El libro de Waltham de Nutrición de perros y gatos". Segunda edición. Zaragoza: Editorial Acribia SA. 11-39.
- BURNELL, JM.** 1971. Changes in bone sodium and carbonate in metabolic acidosis and alkalosis in the dog. *J. Clin. Invest.* 50: 327-331.
- BUSHINSKY, DA.** 1994. Acidosis and bone. *Miner. Electrolyte Metab.* 20:40-52.
- BUSHINSKY, DA.** 1996. Metabolic alkalosis decreases bone calcium efflux by suppressing osteoclasts and stimulating osteoblasts. *Am. J. Physiol.* 271: F216-F222
- BUSHINSKY, DA Y COE, FL.** 1981. Parathyroid hormone (PTH) is calciuric and not calcemic during mild chronic metabolic acidosis. *Clin. Res.* 29: 776A.
- BUSHINSKY, DA; KREIGER, NS; GEISSER, I; GROSSMAN, EB Y COE, FL.** 1983. Effect of pH on bone calcium and proton fluxes in vitro. *Am. J. Physiol.* 245: F204-209.
- BUSHINSKY, DA; GOLDRING, JM Y COE, FL.** 1985a. Cellular contribution to pH mediated calcium flux to neonatal mouse calvaria. *Am. J. Physiol.* 248: F785-789.
- BUSHINSKY DA; RIERA, GS; FAVUS, MJ Y COE, FL.** 1985b. Response of serum 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> to variation of ionized calcium during chronic acidosis. *Am. J. Physiol.* 249: F361-F365.
- BUSHINSKY, DA; KITAKA, MK; WEISINGER, JR; LANGMAN, CB Y FAVUS, MJ.** 1989. Effects of chronic metabolic alkalosis on Ca<sup>2+</sup>, PTH and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in the rat. *Am. J. Physiol.* 257: E578-82.
- BUSHINSKY, DA; SESSLER, NE Y KRIEGER, NS.** 1992. Greater unidirectional calcium efflux from bone during metabolic, compared with respiratory acidosis. *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 262: F435-F431.
- BUSHINSKY, DA Y NILSSON, EL.** 1995. Additive effects of acidosis and parathyroid hormone on Mouse osteoblastic and osteoclastic function. *Am. J. Physiol.* 269: C1364-C1370.

- BUSHINSKY, DA; CHABALA, JM; GAVRILOV, KL Y LEVI-SETTI, R.** 1999. Effects of in vivo metabolic acidosis on midcortical bone ion composition. *Am. J. Physiol.* 277: F813-F819.
- BUSHINSKY, DA Y FRICK, KK.** 2000. The effects of acid on bone. *Curr. Opin. Nephrol. Hypert.* 9: 369-379.
- BUSHINSKY, DA; PARKER, WR; ALEXANDER, KM Y KRIEGER, NS.** 2001. Metabolic, but not respiratory, acidosis increases bone PGE<sub>2</sub> levels and calcium release. *Am. J. Physiol Renal Physiol.* 281: F1058-F1066.
- CALVO, MS; EYRE, DR Y GUNDBERG, CM.** 1996. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr. Rev.* 17 (4): 333-368.
- CAMACHO, J.** 2000. Estadística con SPSS para Windows. Ra-Ma, Madrid.
- CANNIGGIA, ANR; NUTI, R Y LORE, F.** 1981. Pathophysiology of the adverse effects of glucoactive corticosteroids on calcium metabolism on man. *J. Steroid. Biochem.* 15: 153-161.
- CASE, LP; CAREY, DP; HIRAKAWA, DA Y DARISTOTLE, L.** 2000. Minerals. En: Case, LP; Carey, DP; Hirakawa, DA y Daristotle, L. "Canine and feline nutrition. A resource for companion animal professionals". Second edition. St. Louis: Mosby. 41-51.
- CASTILLO, C.** 1993. Influencia fisiológico reproductiva de los niveles séricos de minerales y oligoelementos en las ovejas de raza gallega. memoria de licenciatura. Universidad de Murcia. Facultad de Veterinaria de Murcia.
- CHALLA, A; KRIEG, RJ; THABET, MA; VELDHUIS, JD Y CHAN, JCM.** 1993. Metabolic acidosis inhibits growth hormone secretion in rats: mechanism of growth retardation. *Endocrinol. Metab.* 28: E547-E553.
- CHAN, VL; SAVDIE, E; MASON, RS Y POSEN, S.** 1985. The effect of metabolic acidosis on vitamin D metabolites and bone histology in uremic rats. *Calcif. Tiss. Int.* 30: 694-700.
- CHAO, TY; YU, JC; KU, CH; CHEN, MM; LEE, SH; JANCKILA, AJ; YAM, LT.** 2005. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b is useful serum marker for extensive bone metastasis in breast cancer patients. *Clin. Cancer. Res.* 11 (12 pt 1): 544-50.
- CHAPURLAT, RD Y DELMAS, PD.** 1999. Action de l'hormone de croissance sur le tissu osseux de l'adulte. *Presse Med.* 28 (10): 559-562.

- CHARLES, P; MOSEKILDE, L; RISTELI, L; RISTELI, J Y ERIKSEN, EF.** 1994. Assessment of bone remodelling using biochemical indicators of type I collagen synthesis and degradation: relation to calcium kinetics. *Bone Miner.* 24: 81-94.
- CHENU, C; OPRAN-VALENTIN, A; CHAVASSIEUX, P; SAEZ, S; MEUNIER, PJ Y DELMAS, PD.** 1990. Growth hormone and 1,25dihydroxyvitaminD and activity on human osteoblast like cells in short term cultures. *Bone* 11: 81-6.
- CHEW, DJ Y MEUTEN, DJ.** 1982. Disorders of calcium and phosphorus metabolism. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 12 (3): 411-437.
- CHRISTGAU, S.** 2000. Circadian variation in serum CrossLaps concentration is reduced in fasting individuals. *Clin Chem.* 46 (3): 431.
- COFFEY, T; COMBS, GE Y CAMPBELL, DR.** 1985. Effect of dietary sodium, potassium and chloride levels on performance of weanling swine. *J. Anim. Sci.* 61: 307.
- CONSTABLE, PD.** 1997. A simplified strong ion model for acid-base equilibria: application to horse plasma. *J. Appl. Physiol.* 83: 297-311.
- CONSTABLE, PD.** 1999. Clinical assessment of acid-base status. Strong Ion Difference Theory. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 15 (3): 447-471.
- CONSTABLE, PD.** 2000. Clinical assessment of acid-base status: Comparison of the Henderson-Hasselbalch and Strong Ion Approaches. *Vet. Clin. Pathol.* 29: 115-128.
- CONSTABLE, PD Y STÄMPFLI, HR.** 2005. Experimental determination of net protein charge and  $A_{tot}$  and  $K_a$  of nonvolatile buffers in canine plasma. *J. Vet. Intern. Med.* 19: 507-514.
- COSTA, L; DEMERS, LM; GOUVEIA-OLIVERIA, A; SCHALLER, J; COSTA EB, DE MOURA, MC Y LIPTON, A.** 2002. Prospective evaluation of the peptide-bound collagen type I cross-links N-telopeptide and C-telopeptide in predicting bone metastases status. *J. Clin. Oncol.* 20: 850-856.
- DALLE CARBONARE, L; ARLOT, ME; CHAVASSIEUX, PM; ROUX, JP; PORTERO, NR Y MEURNIER, PJ.** 2001. Comparison of bone microarchitecture and remodeling in glucocorticoid-induced and postmenopausal osteoporosis. *J. Bone. Miner. Res.* 16: 97-103.
- DE MORAIS, HSA.** 1992. A non-traditional approach to acid-base disorders. En: DiBartola, SP. "Fluid Therapy in Small Animal Practice". First Edition. Philadelphia: WB Saunders Co. 297-320.

- DE MORAIS, HSA.** 2005. Editorial: Has Stewart finally arrived in the clinic? *J. Vet. Intern. Med.* 19: 489-490.
- DE OLIVERIA, EC; MURAKAMI, EIKO, A; GALLI, JR; SEGATO, P Y GARCÍA, LM.** 2003. Efeito do balanço electrolítico e subprodutos avícolas no desempenho de frangos de corte na fase inicial (1-21 dias de idade). *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 25 (2): 293-299.
- DELLMANN, DH.** 1993. Connective and supportive tissues En: Dellmann, DH. "Textbook of veterinary histology". Fourth edition. Philadelphia: Lea & Febiger. 29-53.
- DEMERS, LM; COSTA, L Y LIPTON, A.** 2000. Biochemical markers and skeletal metastases. *Cancer* 88 (12 suppl): 2919-2926.
- DEMPSTER, DW.** 1989. Bone histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* 4: 137-141.
- DEROUCHEY, JM; HANCOCK, JD; HINES, RH; CUMMINGS, KR; LEE, DJ; MALONEY, CA; DEAN, DW; PARK, JS Y CAO, H.** 2003. Effects of dietary electrolyte balance on the chemistry of blood and urine in lactating sows and sow litter performance. *J. Anim. Sci.* 81: 3067-3064.
- DERSJANT-LI, Y; SCHULZE, H, SCHRAMA, JW; VERRETH, JA Y VERSTEGEN, MWA.** 2001a. Feed intake, growth, digestibility of dry matter and nitrogen in young pigs as affected by dietary cation-anion difference and supplementation of xylanase. *J. Anim. Physiol. A. Anim. Nutr.* 85: 101-109.
- DERSJANT-LI, Y; VERSTEGEN, MWA; SCHULZE, H; ZANDSTRA, T; BOER, H; SCHRAMA, JM Y VERRETH, JAJ.** 2001b. Performance, digesta characteristics, nutrient flux, plasma composition, and organ weight in pigs as affected by dietary cation anion difference and nonstarch polysaccharide. *J. Anim. Sci.* 79: 1840-1848.
- DERSJANT-LI, Y; VERSTEGEN, MWA; JANSMAN, A; SCHULZE, H; SCHRAMA, JW Y VERRETH, JA.** 2002. Changes in oxygen content and acid-base balance in arterial and portal blood in response to the dietary electrolyte balance in pigs during a 9-h period after meal. *J. Anim. Sci.* 80: 1233-1239.
- DHUPA, N Y PROULX, J.** 1998. Hypocalcemia and hypomagnesemia. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 28 (3): 587-608.

- DIAMOND, T; NERY, L Y POSEN, S.** 1989. Spinal and peripheral bone mineral densities in acromegaly. The effects of excess GH and hypogonadism. *Ann. Int. Med.* 111: 567-573.
- DIBARTOLA, SP.** 1993. Disorders of potassium: hyperkalemia and hypokalemia. En: *Proceedings. Am. Coll. Vet. Intern. Med. 11<sup>th</sup> Annu. Forum* 241-244.
- DIBARTOLA, SP.** 2002a. Trastornos de sodio y agua. En: DiBartola, SP. "Terapéutica de líquidos en pequeñas especies". Segunda edición. México: McGraw-Hill Interamericana. 47-76.
- DIBARTOLA, SP.** 2002b. Introducción a los trastornos ácido-básicos. En: DiBartola, SP. "Terapéutica de líquidos en pequeñas especies". Segunda edición. México: McGraw-Hill Interamericana. 201-224.
- DISHINGTON, IW.** 1975. Prevention of milk fever (hypocalcemic paresis puerperalis by dietary salt supplements. *Acta Vet. Scand.* 16: 503-512.
- DOMINGUEZ, JH Y RAISZ, LG.** 1979. Effects of changing hydrogen ion, carbonic acid and bicarbonato concentrations on bone resorption in vitro. *Calcif. Tiss. Int.* 29: 2-7.
- DURST, RA Y SIGGARD-ANDERSON.** 1994. Electrochemistry. En: Burtis, AB y Ashwood, ER. "Tiezt textbook of clinical chemistry". Second edition. Philadelphia: WB Saunders. 159-182.
- EHRHART, N; DERNELL, WS; HOFFMAN, WE; WEIGEL, RM; POWERS, BE Y WITHROW, SJ.** 1998. Prognostic importance of alkaline phosphatase activity in serum from dogs with appendicular osteosarcoma: 75 cases (1990-1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213: 1002-1006.
- EIAM-ONG, S Y KURTZMAN, NA.** 1994. Metabolic acidosis and bone disease. *Miner. Electrolyte Metab.* 20: 72-80.
- ENDER, F; DISHINGTON, IW Y HELGEBOSTAD, A.** 1971. Calcium balance studies in dairy cows under experimental induction and prevention of hypocalcaemic paresis puerperalis. The solution of the aetiology and the prevention of milk fever by dietary means. *Z. Tierphysiol. Tierernaehr. Futtermittelkd.* 28: 233-356.

- ENDRES, DB Y RUDE, RK.** 1994. Mineral and bone metabolism. En: Burtis, AB y Ashwood, ER "Tiezt textbook of clinical chemistry". Segunda edición. Philadelphia: WB Saunders Co. 1887-1973.
- ERIKSEN, EF; CHARLES, P; MELSEN, F; MOSEKILDE, L; RISTELI, L Y RISTELI, J.** 1993. Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry. *J. Bone Miner. Res.* 8: 127-132.
- ERNST, M Y RODAN, GA.** 1991. Estradiol regulation of IGF-1 expresion in osteoblast cells: evidence for transcriptional control. *Mol. Endocrinol.* 5: 1081-1089.
- ESCOBOSA, A; COPPOCK, CE; ROWE, DL; JENKINS, WL Y GATES, CE.** 1984. Effects of dietary sodium bicarbonate and calcium chloride on physiological responses of lactating dairy cows in hot weather. *J. Dairy Sci.* 67: 574-584.
- ESPINO, L.** 2003. Efectos de la diferencia de cationes y aniones de la dieta en la homeostasis ácido-base y mineral y en la morfología ósea en ovejas. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Veterinaria de Lugo.
- ESPINO, L; TORÍO, R Y GOICOA, A.** 2001. Valoración clínica y laboratorial de los desequilibrios hidroelectrolíticos y ácido-básicos. En: Rejas, J; Fidalgo, LE; Goicoa, A y González, JR. "Aplicaciones de fluidos en veterinaria". Primera Edición. Valencia: Signo Gráfico SL. 35-52.
- ESPINO, L; GUERRERO, F; SUÁREZ, ML; SANTAMARINA, G; GOICOA, A Y FIDALGO, LE.** 2003. Long-term effects of dietary anion-cation balance on acid-base status and bone morphology in reproducing ewes. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 50: 488-495.
- ESPINO, L; SUÁREZ, ML; SANTAMARINA, G; GOICOA, A Y FIDALGO, LE.** 2005. Effects of dietary cation-anion difference on blood cortisol and ACTH levels in reproducing ewes. *J. Vet. Med.* 52: 8-12.
- ESTEPA, JC; AGUILERA-TEJERO, E; LÓPEZ, I; ALMADEN, Y; RODRÍGUEZ, M Y FELSENFELD, AJ.** 1999a. Effect of phosphate on parathyroid hormone secretion in vivo. *J. Bone Mineral. Res.* 14: 1848-1854.
- ESTEPA, JC; LÓPEZ, I; BAS, S; MAYER-VALOR, R Y AGUILERA-TEJERO, E.** 1999b. Valores de referencia de gasometría arterial y estado ácido-básico en perro. *Med. Vet.* 16: 264-269.

- EYRE, DR; PAZ, MA Y GALLOP, PM. 1996. Crosslinking in collagen and elastin. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 717-748.
- FANTI, P; COLOMBO, G; YAO, C; BROWN, SA; VERNON, MW Y MALLUCHE, HH. 1993. Development and characterization of a polyclonal antiserum-based radioimmunoassay for dog osteocalcin. *J. Bone Miner. Res.* 8 (6): 745-752.
- FAUCHON, C; SEOANE, JR Y BERNIER, JF. 1995. Effects of dietary cation-anion concentrations on performance and acid-base balance in growing lambs. *Can. J. Anim. Sci.* 75: 145-151.
- FAWCETT, DW Y JENSH, RP. 1999. Hueso. En: Fawcett, DW y Jensch, RP. "Compendio de histología". Primera edición. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España. 73-85.
- FENCL, V Y LEITH, DE. 1993. Stewart's quantitative acid-base chemistry: applications in biology and medicine. *Respir. Physiol.* 91: 1-16.
- FERMENT, O Y TOUITOU, Y. 1988. Hormonal regulation and metabolic inter-relations of magnesium. *Presse Med.* 17: 584-7.
- FIGGE, J; MYDOSH, T Y FENCL, V. 1992. Serum proteins and acid-base equilibria. A follow-up. *J. Lab. Clin. Med.* 120: 713-719.
- FINK, B; FOX, F; SINGER, J; SKRIPITZ Y FELDKAMP, J. 2002. Monitoring of bone formation during distraction osteogenesis via osteoclastin: a time sequence study in dogs. *J. Orthop. Sci.* 7: 557-561.
- FRAZIER, LW Y YORIO, T. 1990. Prostaglandins as mediators of acidification in the urinary bladder of *Bufo marinus*. *Proc. of the Soc. for Exp. Bio & Med.* 194: 10-15.
- FREDEEN, AH; DEPETERS, EJ Y BALDWIN, RL. 1988a. Characterization of acid/base disturbances and effects on calcium and phosphorus balances of dietary fixed ions in pregnant or lactating does. *J. Anim. Sci.* 66: 159-173.
- FREDEEN, AH; DEPETERS, EJ Y BALDWIN, RL. 1988b. Effects of acid-base disturbances caused by differences in dietary fixed ion balance on kinetics of calcium metabolism in ruminants with high calcium demand. *J. Anim. Sci.* 66: 174-184.
- FUKUDA, S Y IIDA, H. 2000. Effects of orchidectomy on bone metabolism in beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 62 (1): 69-73.

- FULEIHAN, GE; KLERMAN, EB; BROWN, EN; CHOE, Y; BREWIN, EM Y CZEISLER, A.** 1997. The parathyroid hormone circadian rhythm is truly endogenous- a general clinical research center study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 281-286.
- GALLIFORD, TM; MURPHY, E; WILLIAMS, AJ; BASSETT, JH Y WILLIAMS, GR.** 2005. Effects of thyroid status on bone metabolism: a primary role for thyroid stimulating hormone or thyroid hormone? *Minerva Endocrinol.* 30 (4): 237-246.
- GAFTER, U; KRAUT, JA; LEE, DBN; SILIS, V; WALLING, MW; KUOKAWA, K; HAUSSLER, MR Y COBURN, JW.** 1980. Effect of metabolic acidosis on intestinal absorption of calcium and phosphorus. *Am. J. Physiol.* 239 (6): G480-4.
- GANT, RG; SANCHEZ, W Y KINCAID, RL.** 1998. Effect of anionic salts on selenium metabolism in nonlactating, pregnant dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81: 1637-1642.
- GARCÍA-CARRASCO, M; GRUSON, M; DE VERNEJOUL, MC; DENNE, MA Y MIRAVET, L.** 1988. Osteocalcin and bone morphometric parameters in adults without bone disease. *Calcif. Tissue. Int.* 42: 13-17.
- GARTNER, LP Y HIATT, JL.** 1997. Cartílago y Hueso. En: Gartner, LP y Hiatt, JL. "Histología: texto y atlas". Primera edición. México: McGraw-Hill Interamericana. 114-136.
- GASSER, AB; WOOTTON, R; BEYELER, S; CELADA, A Y DEPIERRE, D.** 1980. Biological variation in free serum hydroxyproline concentration. *Clin. Chim. Acta* 106: 39-43.
- GENANT, HK; FUERST, T; FAULKNER, KG Y GLUER, CC.** 1996. In evaluating bone density for osteoporosis, are any of the available methods clearly superior? *Am. J. Roentgenol.* 167: 1589-90.
- GENUTH, SM.** 2006. Regulación endocrina del metabolismo del calcio y del fosfato. En: Levy, MN; Stanton, BA y Koeppen, BM. Berne y Levy: "Fisiología". Cuarta edición. Madrid: Elsevier- Mosby. 631-646
- GERDHEM, P; IVASKA, KK; ALATALO, SL; HALLEEN, JM; HELLMAN, J; ISAKSSON, A; PETTERSSON, K; VÄÄNÄNEN, HK; AKESSON, K Y OBRANT, KJ.** 2004. Biochemical markers of bone metabolism and prediction of fracture in elderly women. *J. Bone Miner. Res.* 19: 386-393.



- GEVAERT, DM; VAN'T KLOOSTER, ATH; DE WILDE, RO Y KAPPERT, HJ.** 1991. Effect of macromineral composition of diets on blood acid-base equilibrium and urinary acidity in dogs. *J. Nutr.* 121: S93-S94.
- GEZEN, SS; EREN, M Y DENIZ, G.** 2005. The effect of different dietary electrolyte balances on eggshell quality in laying hens. *Revue Méd. Vét.* 156 (10): 491-497.
- GIANNOBILE, WV; LYNCH, SE; DENMARK, RG; PAQUETTE, DW; FIORELLINI, P Y WILLIAMS, RC.** 1995. Crevicular fluid osteocalcin and pyridinoline cross-linked carboxiterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) as markers of rapid bone turnover in periodontitis. A pilot study in beagle dogs. *J. Clin. Periodontol.* 22: 903-910.
- GIUSTINA, A Y WEHRENBURG, WB.** 1992. The role of glucocorticoids in the regulation of growth hormone secretion: mechanisms and clinical significance. *Trends Endocrinol. Met.* 3: 306-311.
- GLUCK, SL.** 1998. Acid-Base. *Lancet* 352: 474-479.
- GOFF, JP; HORST, RL Y REINHARDT, TA.** 1988. Duodenum and colon 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25-(OH)<sub>2</sub>D) receptor concentration is increased during lactation in the rat. En: *Proc. Seventh workshop on vitamin D.* 246.
- GOFF, JP; REINHARDT, TA Y HORST, RL.** 1990. Enzymes and factors controlling vitamin D metabolism and action in normal and milk fever cows. *J. Dairy Sci.* 74: 4022-4032.
- GOFF, JP; HORST, RL; MUELLER, FJ; MILLER, JK; KIESS, GA Y DOWLEN, HH.** 1991. Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25-dihydroxyvitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever. *J. Dairy. Sci.* 74: 3863-3871.
- GOFF, JP; REINHARDT, TA Y HORST, RL.** 1995. Milk fever and dietary cation-anion balance effects on concentration of vitamin D receptor in tissue of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78: 2388-2394.
- GOFF, JP Y HORST, RL.** 1997. Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to prepartum rations on milk fever in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 176-186.
- GOFF, JP Y HORST, RL.** 1998. Use of hydrochloric acid as a source of anions for prevention of milk fever. *J. Dairy. Sci.* 81: 284-288.
- GOFF, JP.** 1999. Treatment of calcium, phosphorus and magnesium balance disorders. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 15: 619-639.

- GOFF, JP.** 2000. Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 16: 319-337.
- GOFF, JP Y HORST, RL.** 2003. Role of acid-base physiology on the pathogenesis of parturient hypocalcaemia (Milk fever)- the DCAD theory in principal and practice. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 97: 51-56.
- GOFF, JP; RUIZ, R Y HORST, RL.** 2004. Relative acidifying activity of anionic salts commonly used to prevent milk fever. *J. Dairy Sci.* 87: 1245-1255.
- GOLDHABER, P Y RABADJIA, L.** 1987. H<sup>+</sup> stimulation of cell-mediated bone resorption in tissue culture. *Am. J. Physiol.* 253: E90-E98.
- GOLZ, DI Y CRENSHAW, TD.** 1990. Interrelationships of dietary sodium, potassium and chloride on growth in young swine. *J. Am. Sci.* 68: 2736-2747.
- GOLZ, DI Y CRENSHAW, TD.** 1991. The effect of dietary potassium and chloride on cation-anion balance in swine. *J. Anim. Sci.* 69: 2504-2515.
- GÓMEZ, C; RODRÍGUEZ, M Y CANNATA, JB.** 2004a. Metabolismo el calcio, del fósforo y del magnesio. En: Riancho, JA y González, J. "Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral". Primera edición. Madrid: Jarpyo Editores SA. 7-12.
- GÓMEZ, L; MOYA, L Y VIDAL, S.** 2004b. Tejidos conectivos especializados: cartilaginoso y óseo. En: Gázquez, A y Rodríguez, A. "Tratado de histología veterinaria". Primera edición. Barcelona: Masson SA. 105-125.
- GRAUSS, J Y MARTÍNEZ, MJ.** 2007. Equilibrio ácido-base: menos complicado de lo que parece. *Consulta de Difusión Veterinaria.* 15: 61-69
- GRECO, D Y STABENFELDT, GH.** 1999. Glándulas endocrinas y su función. En: Cunningham, JG. "Fisiología Veterinaria". Segunda edición. México DF: McGraw-Hill-Interamericana. 456-499.
- GREEN, J.** 1994. The physiocochemical structure of bone: cellular and noncelular elements. *Miner. Electrolyte Mebab.* 20: 40-52.
- GREEN, J Y KLEEMAN, CR.** 1991. Role of bone in regulation of systemic acid-base balance. *Kidney Int.* 39: 9-26.

- GROSENBAUGH, DA, GADWSKI, JE Y MUIR, WW.** 1998. Evaluation of a portable clinical analyzer in a veterinary hospital setting. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213: 691-694.
- GROSS, KL; WEDEKIND, KJ; COWELL, CS; SCHOENHERR, WD; JEWELL, DE; ZICKER, SC; DEBRAEKELEER, J Y FREY, RA.** 2000. Nutrientes. En: Hand, MS; Thatcher, CD; Remillard, RL y Roudebush, P. "Nutrición clínica en pequeños animales (Small animal clinical nutrition)". 4ª edición. Colombia: Panamericana. 23-124.
- GUNDBERG, CM; MAKKOWITZ, ME; MIZRUCHI, M Y ROSEN, JF.** 1985. Osteocalcin in human serum: a circadian rhythm. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60: 737-739.
- GUYTON, AC Y HALL, JE.** 2006a. Regulación renal del potasio, el calcio, el fosfato y el magnesio; integración de los mecanismos renales para el control del volumen sanguíneo y del volumen del líquido extracelular. En: Guyton, AC y Hall, JE. "Tratado de Fisiología Médica". Undécima edición. Madrid: Elsevier. 365-382.
- GUYTON, AC Y HALL, JE.** 2006b. Regulación del equilibrio acidobásico. En: Guyton, AC y Hall, JE. "Tratado de Fisiología Médica". Undécima edición. Madrid: Elsevier. 383-401.
- GUYTON, AC Y HALL, JE.** 2006c. Hormona paratiroidea, calcitonina, metabolismo del calcio y el fosfato, vitamina D, huesos y dientes. En: Guyton, AC y Hall, JE. "Tratado de Fisiología Médica". Undécima edición. Madrid: Elsevier. 978-995.
- HADLEY, SP; HOFFMAN, WE; KUHLENSCHMIDT, MS; SANECKI, RK Y DORNER, JL.** 1990. Effect of glucocorticoides on alkaline phosphatase, alanine aminotransferase and gammaglutamyltransferase in cultured dog hepatocytes. *Enzyme* 43: 89-98.
- HALLEEN, J.** 2006. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Immunodiagnostic Systems (IDS)* 3: 1-10.
- HALLEY, JT; NELSON, TS; KIRBY, LK Y JOHNSON, ZB.** 1987. Effect of altering dietary mineral balance on growth, leg abnormalities, and blood base excess in broiler chicks. *Poult. Sci.* 66: 1684-1692.
- HANNON, JP; BOSSONE, CA Y WADE, CE.** 1990. Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research. *Lab. Anim. Sci.* 40: 293-298.
- HANSEN, B.** 2002. Trastornos del magnesio. En: DiBartola, SP. "Terapéutica de líquidos en pequeñas especies". Segunda edición. México: McGraw-Hill Interamericana. 185-197.

- HANSON, DA; WEIS, MA; BOLLEN, AM; MASLAN, SL; SINGER, FR Y EYRE, DR.** 1992. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J. Bone Miner. Res.* 7: 1251-1258.
- HARRIS, WH Y HEANEY, RP.** 1969. Effect of growth hormone on skeletal mass in adult dogs. *Nature* 223: 403-404.
- HART, GR.** 2004. Medical conditions associated with vitamin D deficiency and the clinical consequences. *Immunodiagnostic Systems (IDS)* 1: 1-10.
- HART, GR.** 2005. Overview of vitamin D measurement and methodologies. *Immunodiagnostic Systems (IDS)*. 2: 1-9.
- HAYDON, KD; WEST, JW; NEWTON, GL Y DOVE, CR.** 1989. Effect of varying dietary electrolyte balance on performance and blood components of growing-finishing swine fed in high ambient temperatures. *J. Anim. Sci.* 67 (suppl.1): 254.
- HAYDON, KD; WEST, JW Y McCARTER, MN.** 1990. Effect of dietary electrolyte balance on performance and blood parameters of growing-finishing swine fed in high ambient temperatures. *J. Anim. Sci.* 68: 2400-2406.
- HAZEWINKEL, HA.** 1994. Skeletal disease. En: Wills, JM y Simpson, KW. "The Waltham book of clinical nutrition of the dog and cat". First edition. Oxford: Elsevier Science. 395-423.
- HAZEWINKEL, HAW; HACKENG, WHL; BOSCH, R; GOEDEGEBUURE, SA; VOORHOUT, G; VAN DEN BROM, WE Y BEVERS, MM.** 1987. Influence of different calcium intakes on calciotropic hormones and skeletal development in young growing dogs. *Front. Horm. Res.* 17: 221-232.
- HAZEWINKEL, HAW Y TRYFONIDOU, MA.** 2002. Vitamin D<sub>3</sub> metabolism in dogs. *Mol. Cell. Endocrinol.* 197: 23-33.
- HEDHAMMAR, A; OLSSON, SE; ANDERSSON, SA; PERSSON, L; PETTERSSON, L; OLANSSON, A Y SUDGREN, PE.** 1979. Canine hip dysplasia: a study of heritability in 401 litters of German Shepherd Dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174: 1012-1016.
- HILL, R; BURROWS, C; ELLISON, G Y BAUER, J.** 2001. The effect of texturized vegetable protein from soy on nutrient digestibility compared two beef in cannulated dogs. *J. Anim. Sci.* 79: 2162-2171.

- HOCK, JM Y FONSECA, J.** 1990. Anabolic effects of human synthetic parathyroid hormone (1-34) depends on growth hormone. *Endocrinology* 127: 1804-1810.
- HORST, RL Y JORGENSEN, NA.** 1974. Effect of ammonium chloride on nitrogen and mineral balance in lactating and non-lactating goats. *J. Anim. Sci.* 57: 683-688.
- HORST, RL; GOFF, JP; REINHARDT, AT Y BUXTON, DR.** 1997. Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 80: 1269-1280.
- HOULLIER, P; NORMAND, M; FROISSART, M; BLANCHARD, A; JUNGERS, P Y PAILLARD, M.** 1996. Calciuric response to an acute acid load in healthy subjects and hypercalciuric calcium stone formers. *Kidney Int.* 50: 987-997.
- HURWITZ, S.** 1996. Homeostatic control of plasma calcium concentration. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 31: 42-100.
- IGARASHI, Y; LEE, MY Y MATSUZAKI, S.** 2002. Acid phosphatases as markers of bone metabolism. *J. Chromatogr. B.* 781: 345-358.
- ILKIW, JE; BOSE, RJ Y MARTIN, ICA.** 1991. A comparison of simultaneously collected arterial, mixed venous, jugular venous and cephalic venous blood samples in the assesment of blood-gas and acid-base status in the dog. *J. Vet. Intern. Med.* 5: 294-298.
- ISAKSSON, OG; OHLSSON, C; BENGTTSSON, BA Y JOHANNSSON, G.** 2000. GH and bone-experimental and clinical studies. *Endocr. J.* 47 (suppl): S9-16.
- IZAWA, Y; MAKITA, T Y ICHIKI, H.** 1985. Glucocorticoid-induced bone disorders: nature and mechanisms of glucocorticoid-induced bone disorders in dogs. *Acta vitaminol. Enzymol.* 7 (1-2): 77-84.
- JAJOO, R; SONG, L; RASMUSSEN, H; HARRIS, SS Y DAWSON-HUGHES, BD.** 2006. Dietary acid-base balance, bone resorption, and calcium excretion. *J. Am. Coll. Nutr.* 25: 224-230.
- JANCKILA, AJ; SIMONS, RM Y YAM, LT.** 2004. Alternative immunoassay for tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b using the fluorogenic substrate naphthol ASBI-phosphate and heparin. *Clin. Chim. Acta* 347: 157-167.
- JOHNSON, RJ Y KARUNAJEEWA, H.** 1985. The effects of dietary minerals and electrolytes on the growth and physiology of the young chick. *J. Nutr.* 115: 1680-1690.

- JOYCE, PW; SÁNCHEZ, WK Y GOFF, JP.** 1997. Effect of anionic salts in prepartum diets based on alfalfa. *J. Dairy Sci.* 80: 2866-2875.
- JUDICE, MPM; BERTECHINI, AG; MUNIZ, JA; RODRIGUES, PB Y FASSANI, EJ.** 2002. Balanço cátio-aniônico das rações e manejo alimentar para poedeiras de segundo ciclo. *Ciênc. Agrotec.* 26 (3): 598-609.
- JUPPNER, H; ABOU-SAMRA, AB; FREEMAN, M; KONG, XF; SCHIPANI, E; RICHARDS, J; KOLAKOWSKI, LFJR; HOCK, J; POTTS, JTJR Y KRONENBERG, HM.** 1991. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 254: 1024-6.
- JUUL, A; PEDERSEN, SA Y SORENSEN, S.** 1994. Growth hormone treatment increases serum insulin-like growth factor binding protein 3, bone isoenzyme alkaline phosphatase and forearm bone mineral content in young adults with GH deficiency of childhood onset. *Eur. J. Endocrinol.* 141: 41-49.
- KAMEDA, T; ISHIKAWA, H Y TSUTSUI, T.** 1995. Detection and characterization of apoptosis in osteoclast in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207: 753-760.
- KASSEM, M; BLUM, W; RISTELI, J; MOSEKILDE, L Y ERIKSEN, EF.** 1993. Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 52:222-6.
- KASHIWAGURA, T; DEUTSCH, CJ; TAYLOR, J; ERECINSKA, M Y WILSON, DF.** 1984. Dependence of gluconeogenesis, urea synthesis, and energy metabolism of hepatocytes on intracellular pH. *J. Biochem.* 259: 237-243.
- KAWASHIMA, H; KRAUT, JA Y KUOKAWA, K.** 1982. Metabolic acidosis suppresses 25-hidroxivitamin D<sub>3</sub>-1-hydroxylase in the rat. *J. Clin. Invest.* 70: 135-140.
- KEALY, RD; LAWLER, DF; MONTI, KL; BIERY, D; HELMS, RW; LUST, G; OLSSON, SE Y SMITH, GK.** 1993. Effects of dietary electrolyte balance on subluxation of the femoral head in growing dogs. *Am. J. Vet. Res.* 54 (4): 555-562.
- KEMME-KROONSBERG, C.** 1993. Nutrition and acid-base balance of pigs: a review. Research Institute for livestock feeding and nutrition (IVVO-DLO), Lelystad, Netherlands. 243: 69.

- KNEPPER, MA Y BURG, MB.** 1988. Renal acid-base transport. En: Schrier, RW y Gottschalk, CW. "Diseases of the kidney". Primera edición. San Diego: Little and Brown Co. 211-239.
- KERRIGAN, JR Y ROGOL, AD.** 1992. The impact of gonadal steroid hormone action on growth hormone secretion during childhood and adolescence. *Endocrinol. Rev.* 281-298.
- KIM, CS Y PARK, DH.** 2005. Effects of chronic NH<sub>4</sub>Cl dosage and swimming exercise on bone metabolic turnover in rats. *J. Physiol. Anthropol. Appl. Human Sci.* 24: 595-600.
- KOEPPEN, BM Y STANTON, BA.** 2006. Función del riñón en el equilibrio acidobásico. En: Levi, MN; Koeppen, BM y Stanton, BA. Berne y Levi: "Fisiología". Cuarta edición. Madrid: Elsevier. 573-586.
- KOMNENOU, A; KARAYANNOPOULOU, M; POLIZOPOULOU, ZS; CONSTANTINIDIS, TC Y DESSIRIS, A.** 2005. Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. *Vet. Clin. Pathol.* 34: 35-38.
- KONDO, T; KITAZAWA, R; YAMAGUCHI, A Y KITAZAWA, S.** 2007. Dexamethasone promotes osteoclastogenesis by inhibiting osteoprotegerin through multiple levels. *J. Cel. Biochem.* 21.
- KOTZAMNN, H; YILMAZ, N; LERCHER, P; RIEDL, M; SCHMIDT, A; SCHUSTER, E; KREUZER, S; GEYER, G; FRISCH, H; HÖRL, WH; MAYER, G Y LUGER, A.** 2001. Differential effects of growth hormone therapy in malnourished haemodialysis patients. *Kidney Int.* 60: 1578-1585.
- KRAPF, R; VETSCH, R; VETSCH, W Y HULTER, HN.** 1992. Chronic metabolic acidosis increase the serum concentration of 1,25-Dihydroxyvitamin D in humans by stimulating its production rate. Critical role of acidosis-induced renal hypophosphatemia. *J. Clin. Invest.* 90: 2456-63.
- KRAUT, JA; GORDON, EM; RANSOM, JC; COBURN, JW Y KUROKAWA, K.** 1983. The effect of chronic metabolic acidosis on the end organ responsiveness to parathyroid hormone in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56 (3): 619-22.
- KRAUT, JA; MISHLER, DR Y KUROKAWA, K.** 1984. Effects of changing hydrogen ion, carbonic acid and bicarbonate concentrations on bone resorption in vitro. *Calcif. Tiss. Int.* 29: 7-13.

- KRAUT, JA; MISHLER, DR; SINGER, FR Y GOODMAN.** 1986. The effects of metabolic acidosis on bone formation and resorption in the rat. *Kidney Int.* 30: 694-700.
- KRIEGER, NS; SESSLER, NE Y BUSHINSKY, DA.** 1992. Acidosis inhibits osteoblastic and stimulates osteoclastic activity in vitro. *Am J. Physiol.* 262: F442-F448.
- KRIEGER, NS; PARKER, WR; ALEXANDER, KM Y BUSHINSKY, DA.** 2000. Prostaglandins regulate acid-induced cell-mediated bone resorption. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279: F1077-F1082.
- KRIEGER, NS; BUSHINSKY, DA Y FRICK, KK.** 2003. Cellular mechanisms of bone resorption induced by metabolic acidosis. *Semin. Dial.* 16: 463-6.
- KUNKEL, ME; ROUGHEAD, ZK; NICTER, EA Y NAVIA, JM.** 1986. The effects of dietary acid stress on bone metabolism in young ovariectomized and intact rats. *Br. J. Nutr.* 55: 79-86.
- LABADÍA, A.** 1995. Bases fisiológicas de la reproducción en la hembra. En: García, A; Castejón, F; de la Cruz, LF; González, J; Murillo, MD. "Fisiología Veterinaria". Primera edición. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana. 840-860.
- LACOSTE, H; FAN, TM; DE LORIMIER, LP Y CHARNEY, SC.** 2006. Urinary N-Telopeptide excretion in dogs with appendicular osteosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* 20: 335-341.
- LADLOW, JF; HOFFMANN, WE; BREAR, GJ; RICHARDSON, DC Y ALLEN, MJ.** 2002. Biological variability in serum and urinary indices of bone formation and resorption in dogs. *Calcif. Tissue. Int.* 70: 186-193.
- LANDFIELD, PW Y CADWALLADER-NEAL, L.** 1998. Long-term treatment with calcitriol (1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>) retards a biomarker of hippocampal aging in rats. *Neurobiol Aging* 19: 469-477.
- LANGMAN, CB.** 1989. Calcitriol metabolism during chronic metabolic acidosis. *Semin. Nephrol.* 9: 65-71.
- LAU, K; RODRIGUEZ-NICHOLS, F Y TANNEN, RL.** 1987. Renal excretion of divalent ions in response to chronic acidosis: evidence that systemic pH is not the controlling variable. *J. Lab. Clin. Med.* 109: 27-33.



- LEE, SW; RUSSEL, J Y AVIOLI, LV.** 1977. 25-hydroxycholecalciferol to 1,25-dihydroxycholecalciferol: Conversion impaired by systemic metabolic acidosis. *Science* 195: 994-996.
- LEITH, DE.** 1991. The new acid-base: Power and simplicity. *Proceedings Am. Coll. Vet. Intern. Med. 8<sup>th</sup> Annu. Forum*, New Orleans. 611.
- LEMANN, JJR; LITZOW, JR Y LENNON, EJ.** 1966. The effects of chronic acid loads in normal man: further evidence for the participation of bone mineral in defense against chronic metabolic acidosis. *J. Clin. Invest.* 45: 1608-1614.
- LEMANN, JJR; LITZOW, JR Y LENNON, EJ.** 1967. Studies of the mechanism y which chronic metabolic acidosis augments urinary calcium excretion in man. *J. Clin. Invest.* 47: 1318-1328.
- LEMANN, JJR; GRAY, RW; MAIERHOFER, WJ Y CHEUNG, HS.** 1986. the importance of renal net acid excretion as a determinant of fasting urinary calcium excretion. *Kidney Int* 29: 743-746.
- LEMANN, JJR; GRAY, RW Y PLEUSS, JA.** 1989. Potassium bicarbonate, but not sodium bicarbonate, reduces urinary calcium excretion and improves calcium balance in healthy men. *Kidney Int.* 35: 688-695.
- LEMS, WF; VAN VEEN, GJ; GERRITS, MI; JACOBS, JW; HOUBEN, HH; VAN RIJN; HJ Y BIJLSMA, JW.** 1998. Effect of low-dose prednisone (with calcium and calcitriol supplementation) on calcium and bone metabolism in healthy volunteers. *Br. J. Rheumatol.* 37: 27-33.
- LEVIN, M Y WINAVER, J.** 1989. Effects of systemic alkalosis on urinary magnesium excretion in the rat. *Miner. Electrolyte Metab.* 15: 214-220.
- LEWIS, LD; MORRIS, ML Y HAND, MS.** 1987. Nutrients. En: Lewis, LD; Morris, ML y Hand, MS. "Small Animal Clinical Nutrition". First edition. Kansas: Mark Morris Associates. 1-25.
- LI, Z; KONG, K Y QI, W.** 2006. Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodelling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343: 345-350.
- LIESEGANG, A; REUTTER, R; SASSI, ML; RISTELI, J; KRAENZLIN, M; RIOND, JL Y WANNER, M.** 1999. Diurnal variation in concentrations of various markers of bone metabolism in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 60 (8): 949-953.

- LIESEGANG, A; CHIAPPI, C; RISTELI, J; KESSLER, J Y HESS, HD.** 2007. Influence of different calcium contents in diets supplemented with anionic salts on bone metabolism in periparturient dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 91 (3-4): 120-129.
- LIN, HY; HARRIS, TL; FLANNERY, MS; ARUFFO, A; KAJI, EH; GORN, A; KOLAKOWSKI, LFJR; LODISH, HF Y GOLDRING, SR.** 1991. Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science* 254: 1022-1024.
- LIN, R Y WHITE, JH.** 2003. The pleiotropic actions of vitamin D. *BioEssays* 26: 21-28.
- LINA, BAR Y KUIJPERS, MHM.** 2004. Toxicity and carcinogenicity of acidogenic or alkalogenic diets in rats; effects of feeding  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KHCO}_3$  or  $\text{KCl}$ . *Food Chem. Toxicol.* 42: 135-153.
- LO CASCIO, V; KANIS, JA; BENETTON, MN; BERTOLDO, F; ADAMI, S; POGGI, G Y ZANOLIN, ME.** 1995. Acute effects of deflazacort and prednisone on rates of mineralization and bone formation. *Calcif. Tissue. Int.* 56: 109-112.
- LO CASCIO, V, BALLANTI, P; MILANI, S; BERTOLDO, F; LO CASCIO, C; ZANOLIN, EM Y BONUCCI, E.** 1998. A histomorphometric long-term longitudinal study of trabecular bone loss in glucocorticoid-treated patients: prednisone versus Deflazacort. *Calcif. Tissue Int.* 62: 199-204.
- LÓPEZ, I; AGUILERA-TEJERO, E; FELSENFELD, AJ; ESTEPA, JC Y RODRÍGUEZ, M.** 2002. Direct effect of acute metabolic and respiratory acidosis on parathyroid hormone secretion in the dog. *J. Bone Miner. Res.* 17 (1): 1691-1699.
- LÓPEZ, I; RODRÍGUEZ, M; FELSENFELD, AJ; ESTEPA, JC Y AGUILERA-TEJERO, E.** 2003. Direct suppressive effect of acute metabolic and respiratory alkalosis on parathyroid hormone secretion in the dog. *J. Bone. Miner. Res.* 18 (8): 1478-1485.
- LÓPEZ, I; AGUILERA-TEJERO, E; ESTEPA, JC; RODRÍGUEZ, M Y FELSENFELD, AJ.** 2004. Role of acidosis-induced increases in calcium on PTH secretion in acute metabolic and respiratory acidosis in the dog. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286: E780-E785.
- LÓPEZ, I; AGUILERA-TEJERO, E; ESTEPA, JC; BAS, S; MAYER-VALOR, R; JIMÉNEZ, A Y RODRÍGUEZ, M.** 2005. Diurnal variations in the plasma concentration of parathyroid hormone in dogs. *Vet. Rec.* 157: 344-347.

- LÓPEZ, I; FELSENFELD, AJ; ESTEPA, JC; RODRÍGUEZ, M Y AGUILERA-TEJERO, E.** 2006. Effect of changes in ionized calcium concentration in arterial blood and metabolic acidosis on the arterial partial pressure of oxygen in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 67: 801-8.
- LYLES, KW; JACKSON, TW; NESBITT, T Y QUARLES, LD.** 1993. Salmon calcitonin reduces vertebral bone loss in glucocorticoid-treated beagles. *Am. J. Physiol.* 264: E938-E942.
- MACLEAY, JM; OLSON, JD Y TURNER, AS.** 2004. Effect of dietary-induced metabolic acidosis and ovariectomy on bone mineral density and markers of bone turnover. *J. Bone Miner. Metab.* 22: 561-568.
- MADIAS, NE Y ZELMAN, SJ.** 1986. The renal response to chronic mineral acid feeding: A re-examination of the role of systemic pH. *Kidney Int.* 29: 667-674.
- MAGNER, PO; ROBINSON, L Y HALPERIN, RM.** 1988. The plasma potassium concentration in metabolic acidosis: a re-evaluation. *Am. J. Kidney Dis.* 11: 220-224.
- MAHLBACHER, K; SICURO, A; GERBER, H; HULTER, HN Y KRAPP, R.** 1999. Growth hormone corrects acidosis induced negative nitrogen balance and renal phosphate depletion and attenuates renal magnesium wasting in humans. *Metabolism* 48: 463-70.
- MARIER, JR.** 1982. Quantitative factors regarding magnesium status in the modern-day world. *Magnesium* 1: 3-15.
- MARKOWITZ, ME; ARNAUD, S; ROSEN, JF; THORPY, M Y LAXMINARAYAN, S.** 1988. Temporal interrelationships between the circadian rhythms of serum parathyroid hormone and calcium concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67: 1068-73.
- MARONE, CC Y SUTTON, RA.** 1980. Effects of acute metabolic acidosis and alkalosis on renal magnesium transport. *Kidney Int.* 17: 895A.
- MARONE, CC; WONG, NLM; SUTTON, RAL Y DIRKS, JH.** 1983. Effects of metabolic alkalosis on calcium excretion in the conscious dog. *J. Lab. Clin. Med.* 101: 264-273.
- MARTIN, HE Y JONES, R.** 1961. The effect of ammonium chloride and sodium bicarbonate on urinary excretion of magnesium, calcium, and phosphate. *Am. Heart J.* 62 (2): 206-210.
- MAURER, M; RIESEN, W; MUSER, J; HULTER, HN Y KRAPP, R.** 2003. Neutralization of Western diet inhibits bone resorption independently of K intake and reduces cortisol secretion in humans. *Am. J. Physiol-Renal* 284: F32-40.

- McAULIFFE, JJ; LIND, LJ; LEITH, DE Y FENCL, V.** 1986. Hypoproteinemic alkalosis. *Am. J. Med.* 81: 86-90.
- McSHEEHY, PM Y CHAMBERS, TJ.** 1986. Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* 118: 824-828.
- MEGHJI, S; MORRISON, MS; HENDERSON, B Y ARNETT, TR.** 2001. pH dependence of one resorption: mouse calvarial osteoclast are activated by acidosis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280: E112-E119.
- MENTAVERRI, R; LORGET, F; WATTEL, A; MAAMER, M; KAMEL, S Y BRAZIER, M.** 2000. Régulation ostéoblastique de la survie des ostéoclastes: effets du calcitriol. *Life Sciences* 323: 951-957.
- MERCADO, A; SLATOPOLSKY, E Y KLAHR, S.** 1975. On the mechanism responsible for the phosphaturia of bicarbonate administration. *J. Clin. Invest.* 56: 1386-1395.
- MICHAEL, H; HARKONEN, PL; VAANANEN, HK Y HENTUNEN, TA.** 2005. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 20 (12): 2224-2232.
- MIKI, H; MAERCKLEIN, PB Y FITZPATRICK, LA.** 1997. Effect of magnesium on parathyroid cells: evidence for two sensing receptors or two intracellular pathways? *Am. J. Physiol* 35: E1-E6.
- MINKIN, C.** 1982. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 34: 285-290.
- MOGHADDAM, HN; JANMOHAMMADI, H Y NAFAFABADI, HJ.** 2005. The effect of dietary electrolyte balance on growth, tibia ash and some blood serum electrolytes in young pullets. *International. Poult. Sci.* 4 (7): 493-496.
- MONGIN, P Y SAUVEUR, B.** 1977. Interrelationship between mineral nutrition, acid-base balance, growth and cartilage abnormalities. En: Boorman, KR y Wilson, BJ. "Growth and poultry meat production". First edition. Edinburgh: British Poultry Sciences Ltd. 235.
- MONGIN, P.** 1980. Electrolytes in nutrition. En: *Proceedings. Third Annu Int Minerals Conference.* 1-15.
- MONGIN, P.** 1981. Recent advances in dietary anion-cation balance: applications in poultry. *Proc. Nutr. Soc.* 40 (3): 285-294.

- MOORE, CW.** 1970. Ionized calcium in normal ultrafiltrates and whole blood determined by ion exchange electrodes. *J. Clin. Invest.* 49: 318-325.
- MOORE, SJ; VAN DER HAAR, VD; SHARMA, BK; PILBEAM, TE; BEEDE, DK; BUCHOLTZ, HF; LIESMAN, JS; HORST, RL Y GOFF, JP.** 2000. Effects of altering dietary cation-anion difference on calcium and energy metabolism in peripartum cows. *J. Dairy Sci.* 83: 2095-2104.
- MUNDY, GR Y GUISE, TA.** 1999. Hormonal control of calcium homeostasis. *Clin. Chem.* 45 (8B): 1347-1352.
- NAP, RC; HAZEWINCKEL, HAW Y MOL, HA.** 1992. Prepubertal differences in plasma growth hormone and IGF-1 concentrations related to adult body size in the dog. *J. Endocrinol. Invest.* 15: 91-106.
- NAP, RC; HAZEWINCKEL, HAW Y VAN DEN BROM, WE.** 1993.  $^{45}\text{Ca}$  kinetics in growing miniature poodles challenged by four different dietary levels of calcium. *J. Nutr.* 123: 1826-1833.
- NAP, RC Y HAZEWINCKEL, HA.** 1994. Growth and skeletal development in the dog in relation to nutrition. *Vet. Q.* 16: 50-59.
- NELSON, RW Y COUTO, CG.** 2000. Desequilibrios electrolíticos. En: Nelson, RW y Couto, CG. "Medicina Interna de Pequeños Animales". Segunda Edición. Buenos Aires: Inter-Médica Editorial. 871-889.
- NEWELL, GK Y BEAUCHENE, RE.** 1975. Effects of dietary calcium level, acid stress, and age on renal, serum, and bone responses of rats. *J. Nutr.* 105: 1039-1047.
- NIELSEN, HK; BRIXEN, K Y MOSEKILDE, L.** 1990. Diurnal rhythm in serum activity of wheat-germ lectin-precipitable alkaline phosphatase: temporal relationships with the diurnal rhythm of serum osteocalcina. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 50: 851-856.
- NIJENHUIS, T; RENKEMA, KY; HOENDEROP, JG Y BINDELS, RJ.** 2006. Acid-base status determines the renal expresion of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  transport proteins. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17: 617-26.
- NILSSON, O; MARINO, R; DE LUCA, F; PHILLIP, M Y BARON, J.** 2005. Endocrine regulation of the growth plate. *Horm. Res.* 64: 157-165.
- NISHIZAWA, Y; NAKAMURA, T; OHTA, H; KUSHIDA, K; GORAI, I; SHIRAKI, M; FUKUNAGA, M; HOSOI, T; MIKI, T; CHAKI, O; ICHIMURA, S; NAKATSUKA, K; MIURA, M.** 2005. Guidelines

- for the use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* 23: 97-104.
- NRC.** 2006. Nutrient requirements of dogs and cats. National Research Council of the National Academies. 145-192.
- OBERLEITHNER, H; GREGER, R Y LANG, F.** 1982. The effect of respiratory and metabolic acid-base changes on ionized calcium concentration: in vivo and in vitro experiments in man and rat. *Eur. J. Clin. Invest.* 12: 451-455.
- OETZEL, GR; FETTMAN, MJ; HAMAR, DW Y OLSON, JD.** 1991. Screening of anionic salts for palatability, effects on acid-base status and urinary calcium excretion in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 74: 965-971.
- OLSEN, BR.** 1999. Bone morphogenesis and embryologic development. En: Favus MJ. "American Society for Bone and Mineral Research Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism". Fourth edition. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. 11-14.
- ORLOFF, JJ Y STEWART, AF.** 1995. The carboxy-terminus of parathyroid hormone-Inert or invaluable? *Endocrinology* 136: 4729-4731.
- OSTER, JR; PÉREZ, GO; CANTERBURY, JM; ALPERT, HC Y VAAMONDE, CA.** 1982. Plasma parathyroid hormone and divalent cation response to induction of acute metabolic acidosis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60: 1505-13.
- OSTHER, PJ.** 2006. Effect of acute acid loading on acid-base and calcium metabolism. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 40: 35-44.
- PAGANI, F; FRANCUCCI, CM Y MORO, L.** 2005. Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives. *J. Endocrinol. Invest.* 28 (10 suppl): 8-13.
- PARFITT, AM; HIGGINS, BA; NASSIM, JR; COLLINS, JA Y HILB, A.** 1964. Metabolic studies in patients with hypercalciuria. *Clin. Sci.* 27: 463-482.
- PARK, JH; HAN, IK Y KIM, IB.** 1994. Effects of electrolyte balance (EB: Na+K-Cl) on the growth, blood parameters, urine parameters and nutrient availabilities of weaning pigs. *Korean J. Anim. Nutr. Feedst.* 18: 147-154.

- PARTHEMORE, JG; BURTON, DW Y DEFTOS, LJ.** 1993. Associations and dissociations between serum bone gla protein and alkaline phosphatase in skeletal metabolism. *J. Orthop. Res.* 11: 671-676.
- PATIENCE, JF; AUSTIC, RE Y BOYD, RD.** 1986. The effect of sodium bicarbonate or potassium bicarbonate on acid-base balance status and protein and energy digestibility in swine. *Nutr. Res.* 6: 263-275.
- PATIENCE, JF; AUSTIC, RE Y BOYD, RD.** 1987. Effect of dietary electrolyte balance on growth and acid-base status in swine. *J. Am. Sci.* 64: 457-466.
- PATIENCE, JF Y WOLYNETZ, MS.** 1990. Influence of dietary undetermined anion on acid-base status and performance in pigs. *J. Nutr.* 120: 579-587.
- PATIENCE, JF Y CHAPLIN, RK.** 1997. The relationship among dietary undetermined anion, acid-base balance, and nutrient metabolism in swine. *J. Anim. Sci.* 75: 2445-2452.
- PAYNE, JM.** 1981. Enfermedades metabólicas de los animales domésticos. Zaragoza: Acribia.
- PEHRSON, B; SVENSSON, C; GRUVAEUS, I Y VIRKKI, M.** 1999. The influence of acidic diets on the acid-base balance of dry cows and the effect of fertilization on the mineral content of grass. *J. Dairy. Sci.* 82: 1310-1316.
- PETITO, SL Y EVANS, JL.** 1984. Calcium status of the growing rat as affected by diet acidity from ammonium chloride, phosphate and protein. *J. Nutr.* 114: 1049-59.
- PHILIPPOV, JP; PASCALEV, MD; AMINKOV, BY Y GROSEV, CD.** 1995. Changes in serum carboxyterminal telopeptide of type I collagen in an experimental model of canine osteomyelitis. *Calcif. Tissue Int.* 57: 152-154.
- PHILLIPPO, M Y REID, GW.** 1994. Parturient hypocalcaemia in dairy cows: effects of dietary acidity on plasma minerals and calciotropic hormones. *Res. Vet. Sci.* 56: 303-309.
- POLZIN, DJ; STEVENS, JB Y OSBORNE, CA.** 1982. Clinical application of the anion gap in evaluation of acid-base disorders in dogs. *Comp. Cont. Educ. Pract.* 4 (12): 1021-1032.
- POPOVIC, V; DAMJANOVIC, S; MICIC, D; MANOJLOVIC, D; MICIC, J Y CASANUEVA, FF.** 1993. Modulation by glucocorticoids of growth hormone secretion in patients with different pituitary tumors. *Clin. Neuroendocrinol.* 58: 465-472.

- POPP, AW; ISENEGGER, J; BUERGI, EM; BUERGI, U Y LIPPUNER, K.** 2006. Glucocorticosteroid-induced spinal osteoporosis: scientific update on pathophysiology and treatment. *Eur. Spine J.* 11: 1-15.
- PRICE, CP; KIRWAN, A Y VALDER, C.** 1995. Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of bone resorption. *Clin. Chem.* 41: 641-643.
- PRICE, JS; JACKSON, BF; GRAY, JA; HARRIS, PA; WRIGHT, IM; PFEIFFER, DU; ROBINS, SP; EASTELL, R Y RICKETTS, SW.** 2001. Biochemical markers of bone metabolism in growing thorough-breds: a longitudinal study. *Res. Vet. Sci.* 71: 37-44.
- PRIETO, F.** 1992. Paresia puerperal. Boris 48. Luzán, Madrid.
- PRIETO, F; TORÍO, R Y ALONSO, P.** 2001. Fisiopatología hidrosalina y ácido-básica. En: Rejas, J; Fidalgo, LE; Goicoa, A; González, JR. "Aplicaciones de fluidos en veterinaria". Primera edición. Valencia: Signo gráfico SL. 21-33.
- QUAMME, GA.** 1997. Renal magnesium handling: new insights in understanding old problems. *Kidney Int.* 52: 1180-95.
- QVIST, P; MUNK, M; HOYLE, N Y CHRISTIANSEN, C.** 2004. Serum and plasma fragments of C-telopeptides of type I collagen (CTX) are stable during storage at low temperatures for 3 years. *Clin. Chim. Acta* 350: 167-173.
- RABADJIA, L; BROWN, EM; SWARTZ, SL; CHEN, CJ Y GOLDHABER, P.** 1990. H<sup>+</sup>-stimulated release of prostaglandin E<sub>2</sub> and cyclic adenosine 3',5'-monophosphoric acid and their relationship to bone resorption in neonatal mouse calvaria cultures. *Bone Miner.* 11: 295-304.
- RAISZ, LG.** 1993. Bone cell biology: new approaches and unanswered questions. *J. Bone Min. Res.* 8: S457-S465.
- REIMERS, TJ; SALERNO, VJ Y LAMB, SV.** 1996. Validation and application of solid-phase chemiluminescent immunoassays for diagnosis of endocrine diseases in animals. *Comp. Haemat. Int.* 6: 170-175.
- RO, H; TEMBE, V; KRUG, T; YANG, PJ; BUSHINSKY, DA Y FAVUS, MJ.** 1990. Acidosis inhibits 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> but not cAMP production in response to parathyroid hormone in the rat. *J. Bone Min. Res.* 5: 273-278.



- ROBERTSON, SA.** 1989. Simple acid-base disorders. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 19 (2): 289-306.
- ROBINS, SP; BLACK, D; PATERSON, CR, REID, DM; DUNCAN, A Y SEIBEL, MJ.** 1991. Evaluation of urinary hydroxypyridinium crosslink measurements as resorption markers in metabolic bone diseases. *Eur. J. Clin. Invest.* 21: 310-315.
- ROCHE, JR; DALLEY, D; MOATE, P; GRAINGER, C; RATH, M Y O'MARA, F.** 2003a. Dietary cation-anion difference and the health and production of pasture-fed dairy cows. 1. Dairy Cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 86: 970-978.
- ROCHE, JR; DALLEY, D; MOATE, P; GRAINGER, C; RATH, M Y O'MARA, F.** 2003b. Dietary cation-anion difference and the health and production of pasture-fed dairy cows 2. Nonlactating periparturient cows. *J. Dairy Sci.* 86: 979-987.
- ROCHE, JR; PETCH, S Y KAY, JK.** 2005. Manipulating the dietary cation-anion difference via drenching to early-lactation dairy cows grazing pasture. *J. Dairy Sci.* 88: 264-276.
- RODRÍGUEZ, M.** 1995. Hormonas reguladoras del calcio. En: García, A; Castejón, F; de la Cruz, LF; González, J; Murillo, MD. "Fisiología Veterinaria". Primera edición. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana. 719-738.
- RODRÍGUEZ, MI; ESPINO, L; GARCÍA, J; CARUNCHO, I; GOICOA, A; RIGUEIRA, L Y FIDALGO, LE.** 2007a. Influencia sobre el pH sanguíneo y urinario de dos dietas comerciales de diferente BDAC. *RECVET* 2: 1-4.
- RODRÍGUEZ, MI; GARCÍA, J; SUÁREZ, ML; GOICOA, A; DE LA CRUZ, LF; FIDALGO, LE Y ESPINO, L.** 2007b. Dietary influences on bone formation and resorption in dogs. Aceptado para su publicación en *Proc. ECVIM. Budapest*. Septiembre.
- ROSE, RJ Y CARTER, RJ.** 1980. Intravenous fluid therapy for nonrespiratory acidosis in dogs: a comparison on balance electrolyte solution with fluid rich in potassium and bicarbonate. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 3: 9-19.
- ROSÉN, T; JOHANSSON, G; HALLGREN, P; CAIDAH, K; BOSAEUS, I Y BENGTSSON, BA.** 1994. Beneficial effects of 12 months replacement therapy with recombinant human growth hormone to growth hormone deficient adults. *Endocrinol. Metab.* 1: 55-66.
- ROSOL, TJ; CHEW, DJ; NAGODE, LA Y CHEW, CC.** 1995. Pathophysiology of calcium metabolism. *Vet. Clin. Pathol.* 24: 49-63.

- ROSOL, TJ Y CAPEN, CC.** 1997. Calcium-regulating hormones and diseases of abnormal mineral (calcium, phosphorus, magnesium) metabolism. En: Kaneko, JJ; Harvey, JW and Bruss ML (eds). "Clinical Biochemistry of domestic animals". Fifth edition. San Diego: Academic Press. 619-702.
- ROSOL, TJ; CHEW, DJ; NAGODE, LA Y SCHENCK, P.** 2002. Trastornos del calcio. En: DiBartola, SP. "Terapéutica de líquidos en pequeñas especies". Segunda edición. México: McGraw-Hill Interamericana. 114-171.
- ROSS, JG; SPEARS, JW Y GARLICH, JD.** 1994. Dietary electrolyte balance effects on performance and metabolic characteristics in finishing steers. *J. Anim Sci.* 72: 1600-1607.
- ROSS, MH; KAYE, GI Y PAWLINA, W.** 2003. Bone. En: Ross, MH; Kaye, GI y Pawlina, W. "Histology: a Text and Atlas". Fourth edition. Philadelphia: Lippencott Williams & Wilkins. 180-213.
- ROY, DR; BLOUCH, KL Y JAMISON, RL.** 1982. Effects of acute acid-base disturbances on renal tubule reabsorption of magnesium in the rat. *Am. J. Physiol.* 243 (2): F197-203.
- RUSSELL, KE; HANSEN, BD Y STEVENS, JB.** 1996. Strong ion difference approach to acid-base imbalances with clinical applications to dogs and cats. *Veterinary Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 26: 1185-1200.
- SALMERI, KR; BLOOMBERG, MS; SCRUGGS, SL Y SHILLE, V.** 1991. Gonadectomy in immature dogs: effects on skeletal, physical, and behavioural development. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198 (7): 1193-1203.
- SARKO, J.** 2005. Bone and mineral metabolism. *Emerg. Med. Clin. N. Am.* 23: 703-721.
- SAVEUR, B; GARABEDIAN, C; FELLOU, C; MONGIN, P Y BALSAN, S.** 1977. The effect of induced metabolic acidosis on vitamin D<sub>3</sub> metabolism in rachitic chicks. *Calcif. Tissue. Res.* 23: 121-124.
- SAVEUR, B Y MONGIN, P.** 1978. Interrelationships between dietary concentrations of sodium, potassium and chloride in laying hens. *Br. Poultr. Sci.* 19: 475-485.
- SCHOBER, E.** 1996. Investigation into intraerythrocytic and extraerythrocytic acid-base and electrolyte changes after long-term ammonium chloride administration in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 57 (5): 743-749.

- SCHOENMAKERS, I; NAP, RC; MOL, JA Y HAZEWINKEL, HAW.** 1999. Calcium metabolism: an overview of its hormonal regulation and interrelation with skeletal integrity. *Vet. Q.* 21 (4): 147-152.
- SCHOENMAKERS, I; HAZEWINKEL, HAW; VOORHOUT, G; CARLSON, CS Y RICHARDSON, D.** 2000. Effect of diets with different calcium and phosphorus contents on the skeletal development and blood chemistry of growing great danes. *Vet. Rec.* 147: 652-660.
- SCHONEWILLE, JT; VAN'T KLOOSTER, AT; WOURTESE, H Y BEYNEN, AC.** 1999. Hypocalcemia induced by intravenous administration of disodium ethylenediaminetetracetate and its effects on excretion of calcium in urine of cows fed a high chloride diet. *J. Dairy Sci.* 82: 1317-1324.
- SCOTT, D; LOVERIDGE, N; ABU DAMIR, H; BUCHAN, W Y MILNE, J.** 1993. Effects of acute acid loading on parathyroid hormone secretion and on urinary calcium and cAMP excretion in the growing lamb. *Exp. Physiol.* 78: 157-163.
- SEBASTIAN, A Y MORRIS, JRRC.** 1994. Improved mineral balance and skeletal metabolism in postmenopausal women treated with potassium bicarbonate. *N. Engl. J. Med.* 331: 297.
- SEEMAN, E; WAHNER, HW; OFFORD, KP; KUMAR, R; JONHSON, WJ Y RIGGS, BL.** 1982. Differential effects of endocrine dysfunction on the axial and the appendicular skeleton. *J. Clin. Invest.* 1302-1309.
- SEGURA, R; WEBB, S; TOVAR, JL Y GAUSÍ, C.** 2000. Calcio. En: Segura, R; Webb, S; Tovar, JL y Gausí, C. "Los minerales y la salud". Primera edición. Barcelona: Litografía Rosés, S. A. 11-36.
- SEIBEL, MJ; ROBINS, SP Y BILEZIKIAN, JP.** 1992. Urinary pyridinium crosslinks of collagen: specific markers of bone resorption in metabolic bone disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 3: 263-270.
- SELLMEYER, DE; SCHLOETTER, M Y SEBASTIAN, A.** 2002. Potassium citrate prevents increased urine calcium excretion and bone resorption induced by a high sodium chloride diet. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 2008-2012.
- SENIOR, DF; MERCHANT, SR Y SUNDSTROM, DA.** 1984. Ammonium chloride as a long-term urinary acidifier in the dog. *Calif. Vet.* 38: 7-9.

- SENKOYLU, N; AKYUREK, H; SAMLI, HE Y AGMA, A.** 2005. Assessment the impacts of dietary electrolyte balance levels on laying performance of commercial white layers. *Pak. J. Nutr.* 4 (6): 423-427.
- SHAPIRO, RJ; YONG, CK Y QUAMME, GA.** 1987. Influence of chronic dietary acid on renal tubular handling of magnesium. *Pflugers Arch.* 409: 492-8.
- SHAREGHI, GR Y AGUS, ZS.** 1982. Magnesium transport in the cortical tic ascending limb of Henle's loop of the rabbit. *J. Clin. Invest.* 69: 759-769.
- SHAW, DH.** 1989. Acute response of urine pH following ammonium chloride administration in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1829-1830.
- SHAW, DH.** 1991. Relationship between urine ammonium ion excretion and urine anion gap in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 52 (12): 1956-1959.
- SHINPO, K; KIKUCHI, S; SASAKI, H; MORIWAKA, F Y TASHIRO, K.** 2000. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D-3 on cultured mesencephalic dopaminergic neurons to the combined toxicity caused by L-buthionine sulfoximine and 1-methyl-4-phenylpyridine. *J. NeuroSci Res* 62: 374-382.
- SHULL, RM.** 1978. The value of anion gap and osmolal gap determination in veterinary medicine. *Vet. Clin. Pathol.* 7: 12-14.
- SICURO, A; MAHLBACHER, K; HULTER, HN Y KRAPF, R.** 1998. Effect of growth hormone on renal and systemic acid-base homeostasis in humans. *Am J. Physiol (Renal Physiol.)* 43: F650-7.
- SILVA, JH Y RUIZ MORENO, MJ.** 1998. Calcio y vitamina D. Su relación con el sistema inmunológico. Revisión Bibliográfica. *Med. Vet.* 15: 15-22.
- SIMONS, PCM; HULAN, HW; TEUNIS, GP Y VAN SCHAGEN, PJW.** 1987. Effect of dietary cation-anion balance on acid-base status and incidence of tibial dyschondroplasia of broiler chickens. *Nutrition Reports International* 35 (3): 591-600.
- SINGER, RB Y HASTINGS, AB.** 1948. An improved clinical method for the estimation of disturbances of the acid-base balance of human blood. *Medicine* 27: 223-242.
- SINGH, AK; JIANG, Y; WHITE, T Y SPASSOVA, D.** 1997. Validation of nonradioactive chemiluminescent immunoassay methods for the analysis of thyroxine and cortisol in

- blood samples obtained from dogs, cats, and horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 261-268.
- SPENCER, H; LESNIAK, K; GATZA, CA; OSIS, D Y LENDER, ML.** 1980. Magnesium absorption and metabolism in patients with chronic renal failure and in patients with normal renal function. *Gastroenterology* 79: 26-34.
- STACY, BD Y WILSON, BW.** 1970. Acidosis and hypercaliuria: renal mechanism affecting calcium, magnesium and sodium excretion in the sheep. *Journal of Physiology* 210: 549-564.
- STEIFF, EL Y BAUER, JE.** 2001. Nutritional adequacy of diets formulated for companion animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219 (5): 601-604.
- STEPAN, CM; CRAWFORD, DT; CHIDSEY-FRINK, KL; KE, H Y SWICK, AG.** 2000. Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regul. Pept.* 92: 73-78.
- STEWART, PA.** 1978. Independent and dependent variables of acid-base control. *Resp. Physiol.* 33: 9-26.
- STEWART, PA.** 1983. Modern quantitative acid-base chemistry. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 61: 1444-1461.
- SUTTON, RAL; WONG, NLM Y DIRKS, JH.** 1979. Effects of metabolic acidosis and alkalosis on sodium and calcium transport in the dog kidney. *Kidney international* 15: 520-533.
- SYAKALIMA, M; TAKIGUCHI, M; YASUDA, J Y HASHIMOTO, A.** 1997. The age dependent levels of serum ALP isoenzymes and the diagnostic significance of corticoesteroid-induced ALP during long-term glucocorticoid treatment. *J. Vet. Med. Sci.* 59 (10): 905-909.
- SZENCI, O; FELKAI, F; MÁRCZ, I Y TAKÁCS, E.** 1988. Ionized calcium, total calcium and acid-base values of blood in healthy and acidotic dogs. *J. Vet. Med. A.* 35: 125-128.
- TALWAR, RM; WONG, BS; SVOBODA, K Y HARPER, RPH.** 2006. Effects of estrogen on chondrocyte proliferation and collagen synthesis in skeletally mature articular cartilage. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 64 (4): 600-609.
- THEYSE, LFH; MOL, JA; VOORHOUT, G; TERLOU, M Y HAZEWINKEL, HAW.** 2006. The efficacy of the bone markers osteocalcina and the carboxyterminal cross-linked telopeptide of type-I collagen in evaluating osteogenesis in a canine crural lengthening model. *Vet. J.* 171: 525-531.

- TON, FN; GUNAWARDENE, SC; LEE, H Y NEER, RM.** 2005. Effects of low-dose prednisone on bone metabolism. *J. Bone Miner. Res.* 20 (3): 464-470.
- TOUSSANIT, C Y VEREERSTRAETEN, P.** 1962. Effects of blood pH changes on potassium excretion in the dog. *Am. J. Physiol* 202: 768-772.
- TRYFONIDOU, MA; STEVENHAGEN, JJ; VAN DEN BEMD, GJCM; OOSTERLAKEN, MA; DELUCA, HF; MOL, JA; VAN DEN BROM, WE; VAN LEEUWEN, JPTM Y HAZEWINKE, HAW.** 2002. Moderate cholecalciferol supplementation depresses intestinal calcium absorption in growing dogs. *J. Nutr.* 132: 2644-2650.
- TRYFONIDOU, MA; HOLL, MS; OOSTERLAKEN-DIJKSTERHUIS, MA; VASTENBURG, M; VAN DEN BROM, WE Y HAZEWINKE, HAW.** 2003. Growth hormone modulates cholecalciferol metabolism with moderate effects on intestinal mineral absorption and specific effects on bone formation in growing dogs raised on balanced food. *Domest. Anim. Endocrinol.* 25: 155-174.
- TSANG, R Y MARDER, H.** 1986. Enfermedad ósea. En: Kaplan, LA y Pesce, AJ. "Química Clínica". Primera edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana. 511-534.
- TUCKER, WB; HARRISON, GA Y HEMKEN, RW.** 1988. Influence of dietary cation-anion balance on milk, blood, urine and rumen fluid in lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci* 71: 346-354.
- TUCKER, WB; HOGUE, JF; ADAMS, GD; ASLAM, M; SHIN, IS Y MORGAN, G.** 1992. Influence of dietary cation-anion balance during the dry period on the occurrence of parturient paresis in cows fed excess of calcium. *J. Anim. Sci.* 70: 1238-1250.
- TYZARD, I.** 1995. Inmunología Veterinaria. México DF: McGraw-Hill-Interamericana.
- VAGNONI, DB Y OETZEL, GR.** 1998. Effects of dietary cation-anion difference on the acid-base status of dry cows. *J. Dairy Sci.* 81: 1643-1652.
- VALIMAKI, MJ; TAHTELA, R; JONES, JD, PETERSON, JM Y RIGGS, BL.** 1994. Bone resorption in healthy and osteoporotic postmenopausal women: comparison markers for serum carboxy-terminal telopeptide of type I collagen and urinary pyridinium cross-links. *Eur. J. Endocrinol.* 131: 258-262.
- VAN MOSEL, M; VAN'T KLOOSTER, AT; MOSEL, FV Y VAN DER KUILEN.** 1993. Effects of reducing dietary (Na+K)-(Cl+SO<sub>4</sub>) on bone in dairy cows at parturition. *Res Vet. Sci.* 56: 270-276.

- VAN MOSEL, M; WOUTERSE, HS Y VAN'T KLOOSTER, AT.** 1994. Effects of reducing dietary on bone in dairy cows at parturition. *Res. Vet.Sci.* 56: 270-276.
- VERWAERDE, P; MALET, C; LAGENTE, M; DE LA FARGE, F Y BRAUN, JP.** 2002. The accuracy of the i-STAT portable analyser for measuring blood gases and pH whole-blood samples from dogs. *Res. Vet. Sci.* 73: 71-75.
- WACHMAN, C Y BERNSTEIN, DS.** 1968. Diet and osteoporosis. *Lancet.* 1: 958-959.
- WANG, C Y BEEDE, DK.** 1992. Effects of amonium chloride and sulfate on acid-base status and calcium metabolism of dry Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 75: 820-828.
- WATTS, NB.** 1999. Clinical utility of biochemical markers of bone remodelling. *Cin. Chem.* 45: 8: 1359-1368.
- WEBER, HP; GRAY, RW; DOMINGUEZ, JH Y LEMANN, JJR.** 1976. The lack of effect of chronic metabolic acidosis on 25-OH-vitamin D metabolism and serum parathyroid hormone in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 43: 1047-55.
- WEIR, EC; PHILBRICK, WM; AMLING, M; NEFF, LA; BARON, R Y BROADUS, AE.** 1996. Targeted overexpression of parathyroid-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 19240-5.
- WEST, JW; MULLINIX, BG Y SANDIFER, TG.** 1991. Changing dietary electrolyte balance for dairy cows in cool and hot environments. *J. Dairy Sci.* 74: 1662-1674.
- WHITEHAIR, KJ; HASKINS, SC; WHITEHAIR, JG Y PASCOE, PJ.** 1995. Clinical applications of quantitative acid-base chemistry. *J. Vet. Intern. Med.* 9: 1-11.
- WIEDERKEHR, M Y KRAPF, R.** 2001. Metabolic and endocrine effects of metabolic acidosis in humans. *Swiss. Med. Wkly.* 131: 127-132.
- WILLARD, MD Y DiBARTOLA, SP.** 2002. Trastornos del fósforo. En: DiBartola, SP. "Terapéutica de líquidos en pequeñas especies". Segunda edición. México: McGraw-Hill Interamericana. 172-184.
- WONG, NLM; QUAMME, GA Y DIRKS, JH.** 1985. Actions of parathyroid hormone are not impaired during chronic metabolic acidosis. *J. Lab. Clin. Med.* 105: 472-478.
- WONG, NLM; QUAMME, GA Y DIRKS, JH.** 1986. Effects of acid-base disturbances on renal handling of magnesium in the dog. *Clin. Sci.* 70: 277-284.

- YEN, JT; POND, WG Y PRIOR, RL.** 1981. Calcium chloride as a regulator of feed intake and weight gain in pigs. *J. Anim. Sci.* 52: 778-782.
- YOUNG, B Y HEATH, JW.** 2000. Skeletal tissues. En: Young, B y Heath. "Wheaters' Functional Histology". Fourth edition. Edinburgh: Churchill Livingstone. 172-192.
- YOUNG, JDE; KO, JS Y COHN, ZA.** 1984. The increase in intracellular free calcium associated with IgG 25/1 Fc receptor-ligand interactions: role in phagocytosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 81: 5430-5434.



*Resúmenes*



## 9. RESÚMENES

### 9.1. RESUMEN

Los minerales de la dieta, aunque elementos minoritarios, son componentes esenciales de la misma, ya que sus excesos y defectos traen consigo el desarrollo de importantes patologías tanto en el hombre como en los animales.

A lo largo de los años las concentraciones de los minerales en las dietas caninas han recibido poca atención por parte de los investigadores, de hecho, los niveles empleados en dietas formuladas para perros se han basado en estimaciones extrapoladas de otras especies, sin que se hayan realizado estudios exhaustivos de los requerimientos ni de las posibles interacciones entre los mismos.

El término DED ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ ) fue planteado por Mongin hace casi treinta años en las aves y, desde ese momento, los beneficios y perjuicios de la modificación dietética de este parámetro continúan siendo estudiados ampliamente, sobre todo, en asociación a la producción y al rendimiento cárnico de los animales de renta (vacas, ovejas, cerdos y aves). Los resultados de los estudios realizados hasta ahora indican que la variación de la DED supone, en la mayoría de los casos, la aparición de importantes cambios en el metabolismo ácido-base y mineral lo que consideramos podría estar en relación con la aparición y la prevención de ciertas patologías, tanto en el hombre como en los animales.

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de la influencia de la DED sobre el equilibrio ácido-base y el metabolismo óseo en perros beagle.

Para realizar la parte experimental hemos contado con tres grupos de 7 animales a los que hemos alimentado con tres dietas: control (DED= 132 mEq/kg), catiónica (DED= 264 mEq/kg) y aniónica (DED= 0 mEq/kg). Los cambios en la dieta se realizaron mediante la adición de sales iónicas sobre la dieta control y cada una de ellas fue administrada durante un periodo de 27 días.

La administración de la dieta aniónica ocasionó la aparición de una tendencia hacia la acidosis metabólica hiperclorémica con la aparición de compensación respiratoria parcial.

Dicha dieta provocó un aumento de la concentración de cloro y de calcio iónico sanguíneo y un descenso en los niveles de potasio, mientras que el resto de los minerales no estuvieron sujetos a variaciones. Los niveles de cortisol sérico presentaron una tendencia a la elevación y el TCTI, marcador de resorción ósea, estuvo significativamente aumentado en el grupo de animales alimentados con la dieta aniónica.

La dieta catiónica no produjo efectos significativos respecto a la dieta control.

Por todo esto concluimos que la administración de dietas con una DED baja (en torno a 0 mEq/kg) trae consigo la aparición de alteraciones ácido-básicas y de un aumento de la resorción ósea mediada por células, hecho que debería tenerse en cuenta a la hora de formular los piensos caninos.

## 9.2. SUMMARY

Dietary minerals, although minority elements, are essential components of diets and their excesses and deficiencies induce important health disturbs in humans and animals.

Throughout many years, mineral concentration on canine diets have received little attention, in fact, dog diets mineral levels have been based on extrapolations of other species requirements, without having done thorough investigations of mineral requirements and their interactions.

Nearly thirty years ago, Mongin proposed the dietary electrolyte difference concept (Na+K-Cl) in birds, and, ever since this moment, the benefices and damages of this modification has been studied at length so far in association with production and performance on farm animals (cows, sheep, pigs and domestic fowls). The results of the studios carried out until now show that the changes in dietary electrolyte balance provoke, in most of cases, important changes in acid-base and mineral metabolism. We consider that this fact could be in association with both the development and the prevention of some illnesses, and not only in men but also in animals.

The main aim of this study is to evaluate the effects of DED on acid-base status and bone metabolism in beagle dogs.

In the experimental protocol we have used three groups of seven dogs each one, every group was fed with one of the three diets: control (DED= 132 mEq/kg), anionic (DED= 0 mEq/kg) and cationic (DED= 264 mEq/kg). Changes in DED were achieved adding ionic salts on control diet. We administer each diet during 27 days periods.

Anionic diet induced a tendency to hiperchloremic metabolic acidosis that was partially compensated by respiratory mechanisms. This diet provoked a rise in ionic calcium and chloride and a drop in potassium concentrations, whereas the rest of plasma mineral concentrations were not affected by dietary treatment. Serum cortisol levels showed a tendency to rise and carboxyterminal telopeptide of type I collagen concentrations, a bone resorption marker, were significant higher in this group.

When the animals were fed with cationic diets their analytical parameters did not show significant differences in regards to control diet.

It is concluded that the administration of low DED diets (about 0 mEq/kg) provokes acid-base disturbs and an increase on cell-mediated bone resorption, this fact must be taken into account in dry dog food elaboration.